



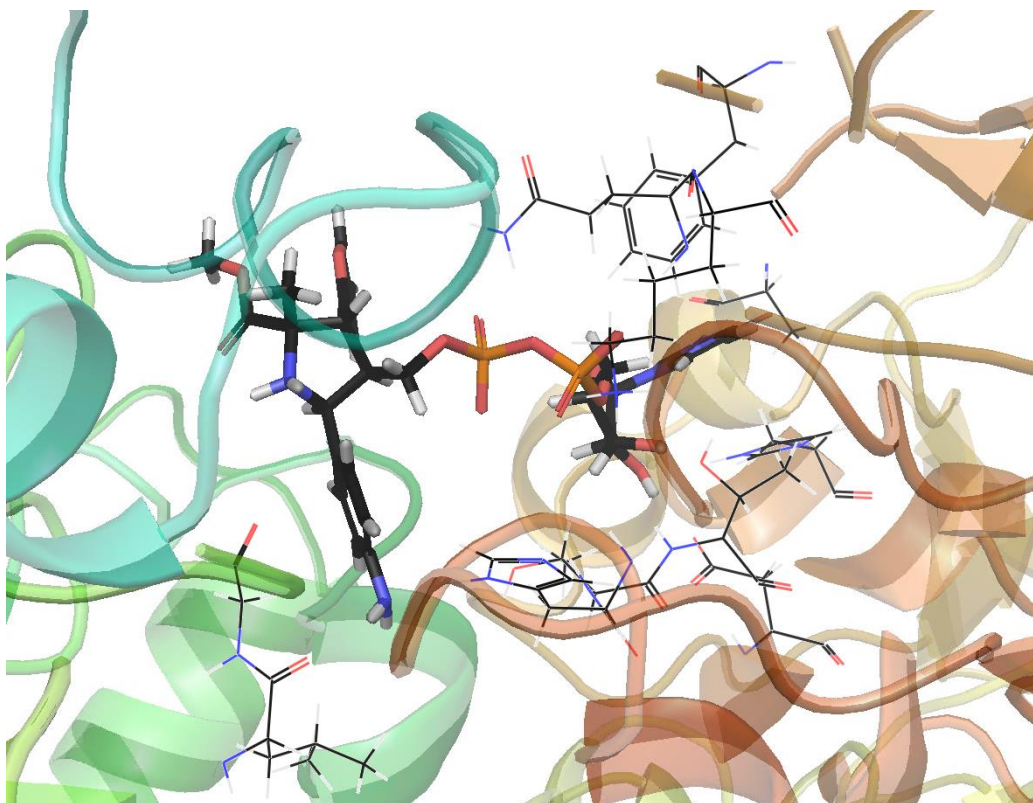
Universidad
Zaragoza



Master en química molecular y catálisis homogénea

Trabajo final de master

Diseño racional de ligandos enzimáticos.



Ignacio Jesús Sanz Martínez.

Director: Prof. Dr. Pedro Merino

Departamento de Química Orgánica
Grupo de Química Biológica y Computacional

Zaragoza, junio 2019

Diseño racional de ligandos enzimáticos

Resumen:

Las glicosiltransferasas son los enzimas que se encargan de transferir azúcares a diversos receptores.

Entre las glicosiltransferasas se encuentra la *N*-acetilgalactosaminiltransferasa (GalNAc-T), la cual se encarga de la transferencia de *N*-acetilgalactosamina. Dicho enzima se relaciona con multitud de procesos biológicos y enfermedades en los seres vivos, incluidos humanos, lo que hace que sea una potencial diana para el desarrollo de moléculas que puedan inhibir su funcionamiento y así convertirse en potenciales fármacos para dichos trastornos.

A lo largo de este trabajo se procede al diseño y estudio computacional de diferentes inhibidores dirigidos a dos isoformas de la GalNAc-Ts, la T2 y la T3. En todos ellos se busca una buena biodisponibilidad además de, por supuesto, un buen modo de unión con el enzima, con el objetivo de servir de base a posteriores síntesis experimentales y estudios *in vitro*.

Rational design of enzymatic ligands.

Abstract:

Glycosyltransferases are the enzymes responsible to transfer sugars to different receptors.

Within the glycosyltransferases there is GalNAc Transferase (GalNAcT) that promotes the *N*-acetylgalactosamine transference. The GalNAcT is related to many diseases in mammals, and therefore, GalNAcT is a potential target for the development of new drugs. That could inhibit the enzyme and thus control the disease.

In this project, different inhibitors have been designed for the T2 and T3 isoforms of this enzyme. In all cases we are looking for bioavailability and good *binding* with the protein.

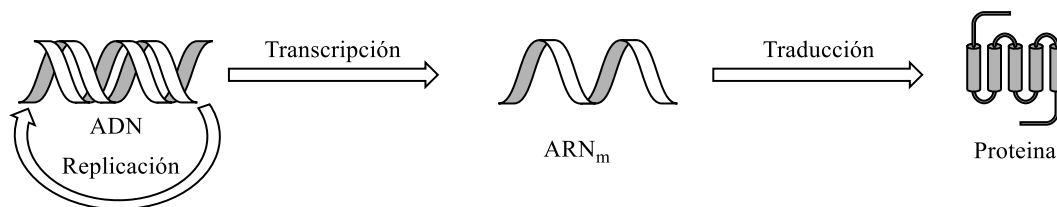
One of the goals of this work is to be useful for future studies.

Índice.

1. Introducción.....	5
1.1. Glicosiltransferasas (GTs).....	6
1.2. UDP-N-acetil- α -D-galactosamina: N-acetilgalactosaminiltransferasas (GalNAc-Ts).....	10
2. Antecedentes.....	11
3. Objetivos.....	12
4. Métodos computacionales.....	12
4.1. Docking.....	14
5. Procedimiento experimental.....	15
5.1. Preparación de la proteína.....	16
5.2. Preparación de los ligandos.....	16
5.3. Glide.....	17
6. Resultados y discusión.....	17
6.1. GalNAc-T2 vs GalNAc-T3.....	17
6.2. Ligandos diseñados.....	19
6.3. Docking GalNAc-T2.....	20
6.4. Docking GalNAc-T3.....	27
6.5. Comparativa docking GalNAc-T2 y GalNAc-T3.....	33
7. Conclusiones.....	34
8. Bibliografía.....	35
9. Anexos.....	38
9.1. Estructura, nombre y abreviatura de los 20 aminoácidos proteicos en humanos.....	38
9.2. Tablas Suplementarias.....	39
9.3. Figuras suplementarias.....	45

1. Introducción

Los mecanismos de transmisión y expresión de la herencia genética se recogen en el denominado dogma central de la Biología (esquema 1).¹ En éste se diferencian dos procesos clave, a saber: la replicación y la expresión del ADN. La expresión génica incluye dos procesos en sí misma: la transcripción, donde el ADN sirve de molde para la síntesis de una cadena de ARNm, y la traducción donde dicho ARNm es leído en los ribosomas que sintetizan una proteína.



Esquema 1: dogma central de la biología molecular

Sin embargo, cuando se compara la secuencia genética de un chimpancé frente a la de un ser humano se encuentra una equivalencia de hasta un 99.9%. Por consiguiente, lo que nos ha hecho evolucionar frente a otras especies no es la aparición de nuevos genes, puesto que solo hemos duplicado, cambiado ligeramente, reorganizado, o incluso perdido algunos en los últimos 6 millones de años.²

La diferenciación entre unas especies y otras no se debe únicamente a la secuencia genética. Las modificaciones post-traduccionales de las proteínas sintetizadas en los ribosomas juegan un papel fundamental ya que es la incorporación de dichas modificaciones lo que hace que la proteína sea funcional. Las modificaciones postraduccionales más comunes son la incorporación de un carbohidrato (glicosilación), de un grupo fosfato (fosforilación), de un resto de ácido palmítico (palmitoilación) o de una molécula de ubiquitina (ubiquitinación).³

De las modificaciones mencionadas anteriormente la glicosilación es la más frecuente. Se estima que un 47% de las proteínas de los seres humanos se encuentran glicosiladas.⁴ Por consiguiente, los enzimas que se encargan de catalizar la transferencia de las unidades de azúcar sobre las correspondientes proteínas tendrán un papel fundamental en el correcto desarrollo del organismo. Estos enzimas se denominan **glicosiltransferasas** y, sin duda, son cruciales en el desarrollo de actividades biológicas fundamentales de los seres vivos.⁵

1.1. Glicosiltransferasas(GTs)

Las glicosiltransferasas catalizan la reacción de transferencia de una unidad de azúcar utilizando un carbohidrato activado por un nucleótido. Estos carbohidratos activados se conocen como dadores de Leloir, y prácticamente la totalidad de glicosiltransferasas utilizan únicamente 9 de ellos (Figura 1).⁶

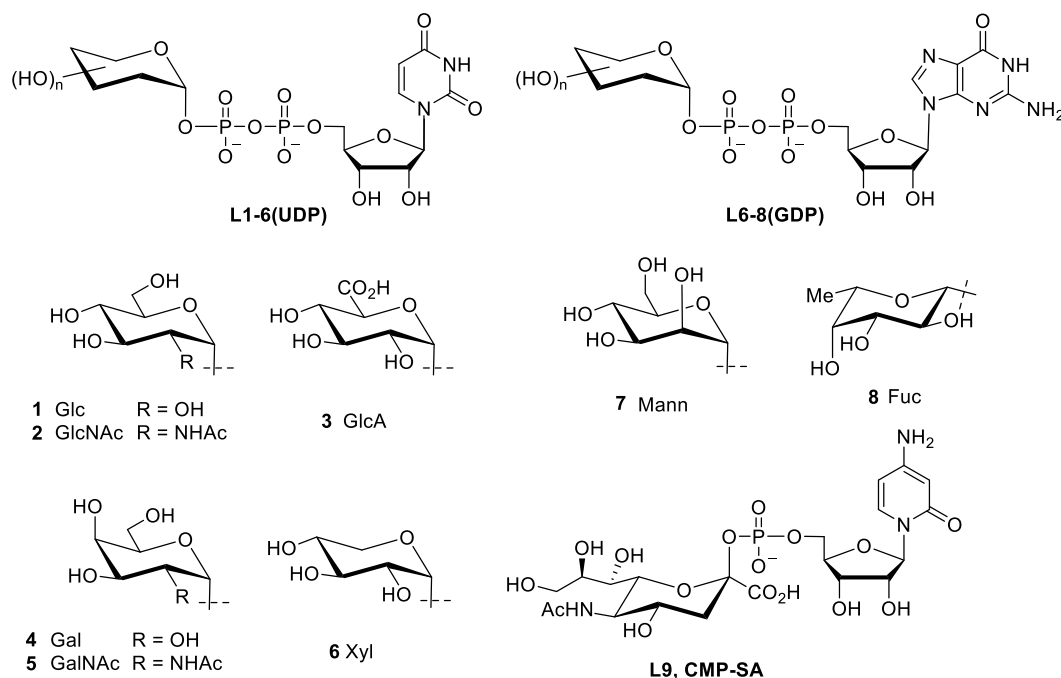


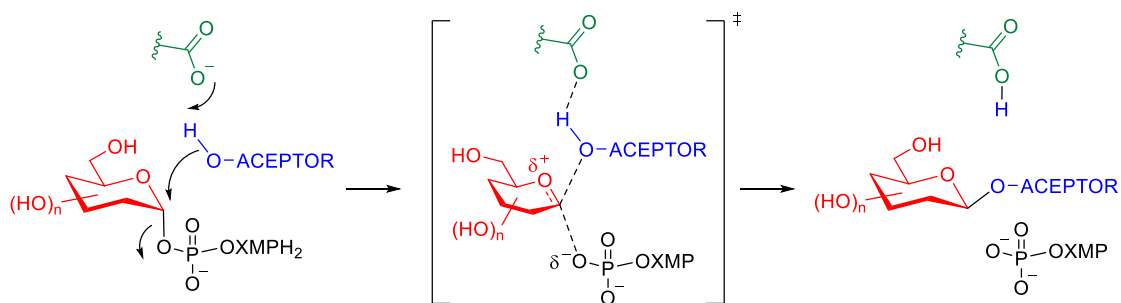
Figura 1: Dadores de Leloir: sustratos naturales para GTs. UDP-glucosa (Glc) **L1**, UDP-N-Ac-glucosamina (GlcNAc) **L2**, UDP-ácido glucurónico (GlcA) **L3**, UDP-galactosa (Gal) **L4**, UDP-N-Ac-galactosamina (GalNAc) **L5**, UDP-xilosa (Xyl) **L6**, GDP-manosa (Mann) **L7**, GDP-fucosa (Fuc) **L8**, y CMP-ácido siálico (SA) **L9**

El carbohidrato activado tiene la estructura de nucleótido difosfato de uridina o guanosina enlazado al carbono anomérico del azúcar que se va a transferir, a excepción del dador **L9** que contiene citidina monofosfato.

La reacción de glicosilación puede dar lugar a dos productos en función de que se retenga o se produzca una inversión del carbono anomérico del sustrato dador una vez producida la transferencia del azúcar.⁷ El mecanismo de reacción sucedido en el enzima será fundamental para determinar si se obtiene un producto u otro.

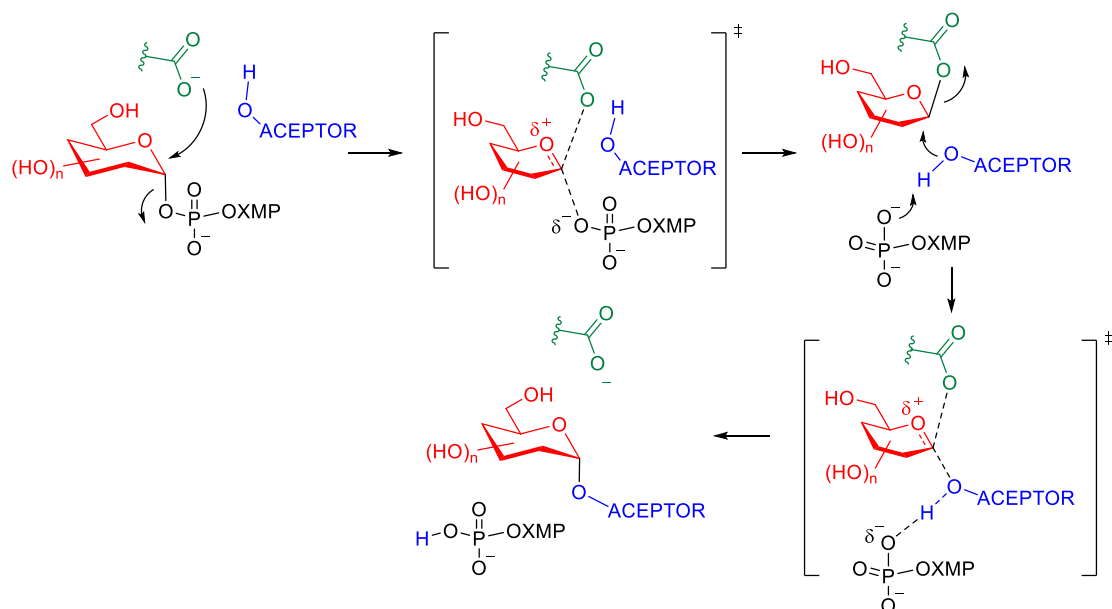
Aunque, en muchos casos no se conoce el mecanismo de acción de estos enzimas con detalle, sí que existen algunas evidencias experimentales.

Que se produzca una inversión del centro anomérico precisa de un mecanismo S_N2 y para ello se precisan de aminoácidos en el sitio activo con capacidad de desprotonar la especie nucleófila del sustrato aceptor (Esquema 2).⁸

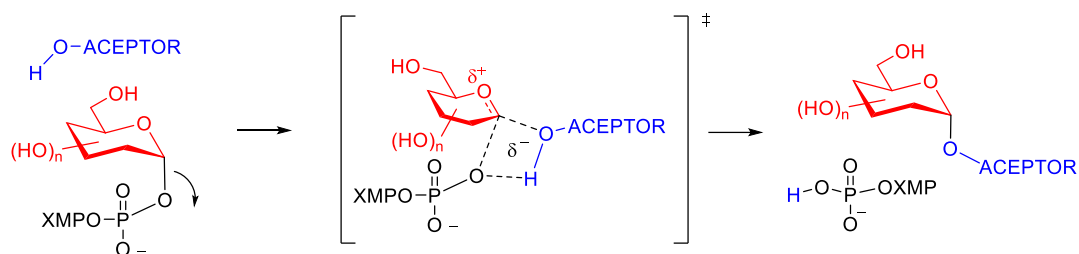


Esquema 2: Mecanismo de reacción tipo S_N2 con inversión del centro anomérico

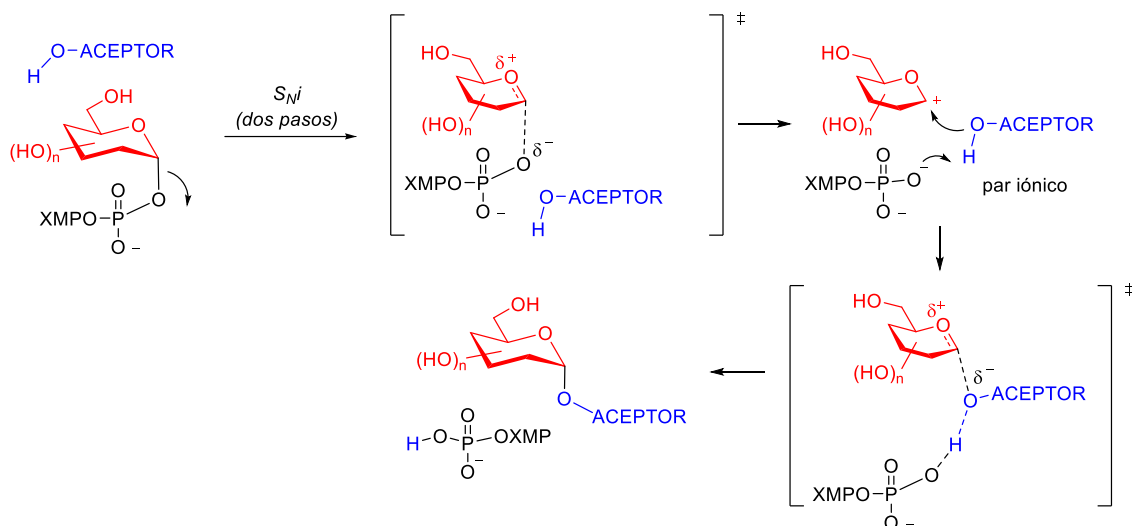
Existen varias hipótesis para explicar el mecanismo de retención de configuración, como puede ser una doble inversión (Esquema 3) y una reacción tipo S_{Ni} , la cual a su vez puede suceder en un paso (Esquema 4) o en dos (Esquema 5). En ambos casos se basa en que las interacciones de los residuos que conforman el sitio activo estabilicen un estado de transición tipo oxocarbenio.⁹



Esquema 3: mecanismo de doble inversión que otorga el producto de retención



Esquema 4: Mecanismo tipo S_{NI} en un paso que otorga el producto de retención



Esquema 5: Mecanismos tipo S_{NI} en dos pasos que otorga el producto de retención.

Muchas glicosiltransferasas presentan un átomo metálico, $Mg(II)$ o $Mn(II)$, en el sitio activo. En estos casos el centro metálico coordina al dador de Leloir por el difosfato, actuando como ácido de Lewis y favoreciendo la salida del nucleótido difosfato en la transferencia del azúcar (Figura 2).¹⁰

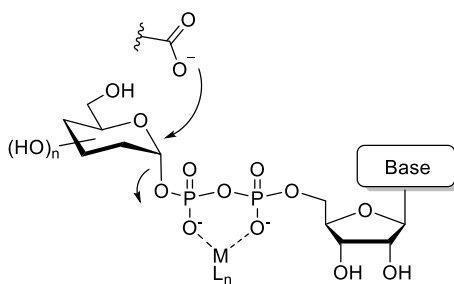


Figura 2: Interacción del metal con el dador de Leloir.

Existen numerosas glicosiltransferasas, generalmente agrupadas en familias, dependiendo del tipo de azúcar que transfieren. Entre las más importantes se encuentran, la *N*-acetilglucosaminil transferasa (OGT) que transfiere unidades de *N*-acetilglucosamina,¹¹ la familia de las O-fucosiltransferasas (POFUTs) que trasfieren

unidades de fucosa¹² y la familia de las *N*-acetilgalactosaminil transferasas (GalNac-Ts) que transfieren unidades de *N*-acetilgalactosamina, objeto de estudio en este trabajo.

Todas ellas son dianas terapéuticas para el desarrollo de moduladores enzimáticos como precursores de fármacos, puesto que su disfuncionalidad o sobreexpresión se relaciona con diferentes enfermedades como el desarrollo de algunos tipos de cáncer,¹³ esterilidad,¹⁴ alzheimer,¹⁵ etc. Por este motivo, el tratamiento de las enfermedades provocadas por la sobreexpresión de estos enzimas pasa por el diseño de inhibidores enzimáticos.

Una buena estrategia para conseguir el desarrollo de inhibidores enzimáticos es diseñar una molécula que mimetice el ligando natural del enzima, dando lugar a un mayor número de interacciones y que así sea capaz de desplazar al sustrato natural del sitio activo (inhibición competitiva). Para lograr este tipo de sustratos se han seguido diferentes alternativas (Figura 3).

- Modificación de la unidad de carbohidrato (Figura 3, **I1**).¹⁶
- Modificación del anillo de ribosa (Figura 3, **I2**).
- Modificaciones en la base nitrogenada (Figura 3, **I3**).¹⁰
- Desarrollo de inhibidores bifuncionales,¹⁷ basados en dos fragmentos conjugados que interaccionan, y por consiguiente inhiben, tanto el sitio del dador como el aceptor dentro de la encima (Figura 3, **I4**).

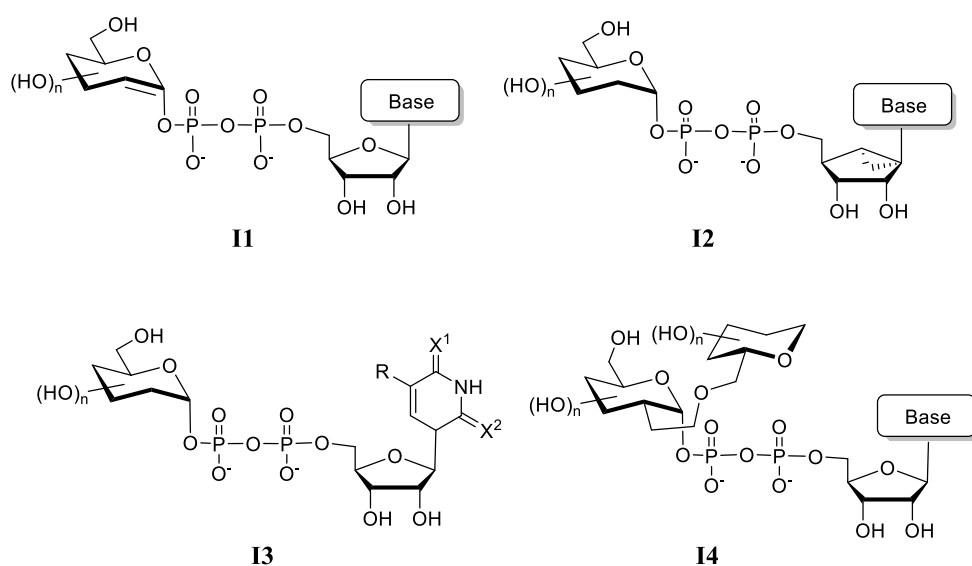


Figura 3: Ejemplos de alternativas clásicas en el diseño de inhibidores para glicosiltransferasas

Los ensayos *in vitro* realizados con estos ligandos muestran muy buenos resultados de inhibición enzimática, sin embargo, la presencia de grupos difosfato dota de una elevada polaridad a la molécula lo que conlleva a una baja permeabilidad celular impidiendo el acceso a la diana terapéutica (baja bioaccesibilidad) y disminuyendo su actividad.¹⁸

Entre todas las glicosiltransferasas en este trabajo nos centraremos en la UDP-*N*-acetil- α -D-galactosamina transferasa: *N*-acetilgalactosaminiltransferasa, encargada de transferir unidades de *N*-Acetilgalactosamina. Los glicopéptidos que contienen estas unidades se relacionan con procesos de reconocimiento celular en varios procesos metabólicos,¹⁹ el desarrollo de algunos cánceres como el de pulmón,²⁰ la disminución de la eficacia de alguno de los fármacos desarrollados,²¹ etc. Por ello, el desarrollo de inhibidores sobre estas enzimas es un punto de partida para generar nuevos fármacos.

1.2. UDP-*N*-acetil- α -D-galactosamina: *N*-acetilgalactosaminiltransferasas (GalNAc-Ts)

Las GalNAcTs catalizan la transferencia de unidades de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) usando como sustrato dador el nucleósido del azúcar con uridina difosfato (UDP-GalNAc) (**L5**) sobre los OH de residuos de serina o treonina de diferentes péptidos en presencia de Mn (II).²²

La GalNAc-Ts son un grupo de enzimas que comprenden hasta 20 isoformas (enzimas que catalizan la misma reacción química, pero presentan secuencias diferentes de aminoácidos) distintas en seres humanos. Estos isoenzimas se agrupan en la base de datos CAZy (Carbohydrate-Active enZyme data-base) en la familia número 27 dentro de las glicosiltransferasas. Todas estas isoformas se encuentran en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico en las células eucariotas.²⁰

Todos los isoenzimas realizan la transferencia del azúcar manteniendo la configuración del carbono anomérico (Esquemas 3-5). Desde un punto de vista estructural presentan un dominio catalítico *N*-terminal adoptando un pliegue tipo GT-A y un dominio tipo lectina que actúa como centro de unión a carbohidratos. Ambos dominios están conectados por una secuencia peptídica flexible (Figura 4).²³

Otra característica estructural clave de estos isoenzimas es la presencia en el dominio catalítico de un *Loop* flexible, responsable de las dos conformaciones posibles del enzima, abierta o inactiva y cerrada o activa (Figura 4a y 4b).²⁰

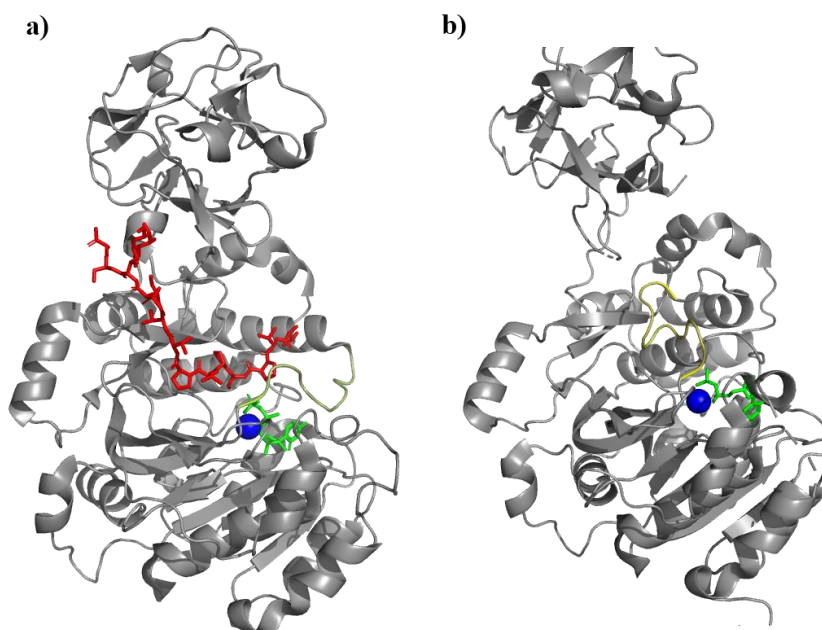


Figura 4: Estructura tridimensional GalNAc-T2 en representación de los isoenzimas de la GalNAc-Ts. En rojo el glicopéptido con el que se cristalizó el enzima, en azul el centro de Mn(II) en verde la UDP de la cristalización y amarillo el loop a) cerrado b) abierto. En ambas estructuras se puede observar el dominio catalítico en la parte inferior de la proteína y el dominio tipo lectina en la superior.

2. Antecedentes del grupo de investigación

El grupo de Química Biológica y Computacional de la universidad de Zaragoza, donde he realizado este trabajo de fin de Master, entre otros campos de investigación, se ha centrado en el estudio de glicosiltransferasas como OGT, GalNAc-T2, POFUT 1 y 2,²⁴ PimA y Gpgs.²⁵

En el grupo de investigación se han preparado inhibidores de GTs cuya estructura general se corresponde con la sustitución del azúcar por una pirrolidina (Figura 5a) y además la sustitución del difosfato por una cadena alifática y un fosfonato (Figura 5b) con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad de los ligandos.

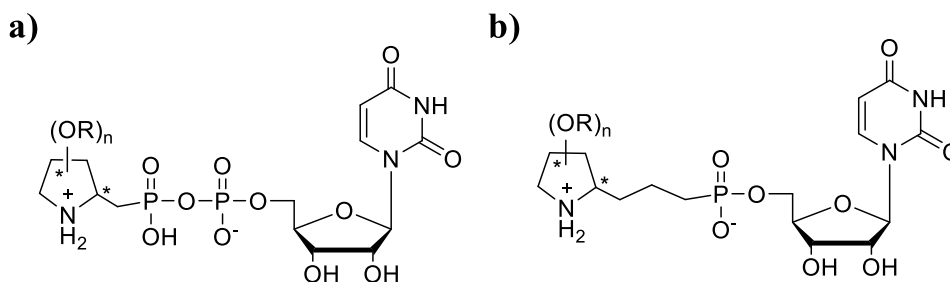


Figura 5: Estructura general de los inhibidores desarrollados en el grupo de investigación

Las pirrolidinas se pueden sintetizar con diferentes sustituyentes de forma controlada, gracias a reacciones organocatalíticas²⁶⁻²⁷ y reacciones de adición nucleófila²⁸. Se han realizado estudios preliminares sobre su actividad en *hOGT* y *GalNAc-T2* y los mejores resultados se han obtenido con sustituyentes hidroxilo (OH) y benciloxi (OBn).

El diseño racional de inhibidores, además de ser la base para un posterior desarrollo de agentes terapéuticos, permite obtener evidencias experimentales acerca del mecanismo de reacción, mediante la cristalización de complejos ligando-proteína o incluso complejos ternarios proteína-ligando-aceptor.⁸

3. Objetivos

El objetivo de este trabajo será llevar a cabo una valoración mediante estudios de *docking*, de potenciales inhibidores de *GalNAc-T2* y la *GalNAc-T3*. Este estudio es el primer paso en el diseño racional de inhibidores enzimáticos y debe realizarse siempre de forma previa a la síntesis de moléculas complejas ya que permite identificar a los mejores candidatos.

Para desarrollar el objetivo principal del trabajo se plantean una serie de sub-objetivos específicos:

1. Elección de ligandos a estudiar
2. Preparación de las proteínas
3. Preparación de los ligandos
4. Estudios de *docking*
5. Análisis de resultados

Los resultados obtenidos podrán emplearse, además, para realizar un estudio comparativo entre la conformación de los sitios activos, los aminoácidos que lo conforman, las interacciones que tienen lugar entre aquéllos y los ligandos, y con ello determinar la variación de la afinidad de los enzimas por los diferentes ligandos.

4. Métodos computacionales

Los estudios de *docking* se han llevado a cabo con *Glide* que es un software de acoplamiento molecular, que se encuentra implementado en *Maestro*, ambos incluidos en el paquete Schrödinger.²⁹

CLC Sequence viewer (Omicx),³⁰ permite llevar a cabo una comparación sobre la estructura primaria desde los archivos de texto que contienen las secuencias peptídicas

(obtenidos desde la web: <https://www.uniprot.org/>) de varias proteínas y estimar el grado de conservación de residuos. Este programa no solapa un péptido frente a otro de forma lineal desde el primer residuo, sino que los alinea homologando las posiciones en cada aminoácido.

La obtención de los ligandos se realizó mediante *CORINA-3DModel*,³¹ que permite obtener los ficheros PDB (Fichero de almacenaje de información, que en nuestro caso particular contiene la información estructural de los ligandos o enzimas) desde sus códigos *Smiles*.

Como herramienta de dibujo químico se usó *ChemDraw*.³²

La estructura de los diferentes aminoácidos para comprender mejor las interacciones puede consultarse en los anexos.

La enumeración de los carbonos en la descripción de las interacciones es arbitraria, aunque se intenta mantener el mismo criterio para todos. Sin embargo, que haya un difosfato (Figura 6a) o una cadena carbonada en el puente (*linker*) (Figura 6b) varía el número de carbonos y por consiguiente la numeración de los mismos.

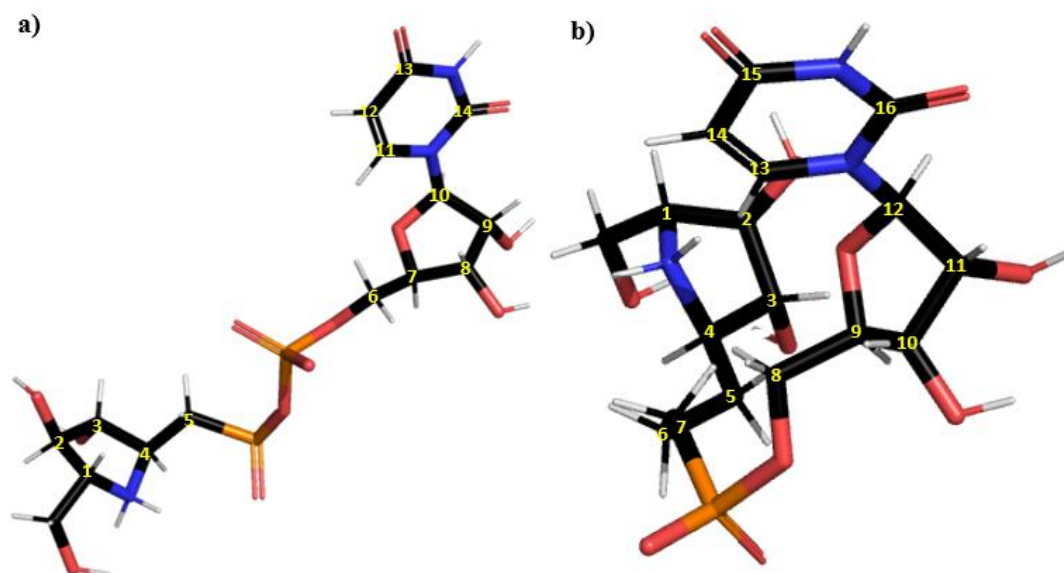


Figura 6: Ejemplo de enumeración de los carbonos que se siguió en la descripción de los ligandos. a) especies difosfato. b) especies monofosfato

4.1. Docking

La primera hipótesis que se planteó sobre el funcionamiento de un enzima fue el modelo de ajuste llave cerradura (lock-and-key), el cual sería fácilmente reproducible por un ajuste rígido. Pero con el paso del tiempo se propusieron alternativas que se adecuaban mejor a la situación real.

Primero Koshland propuso que se producía un ajuste inducido, es decir, que se producían cambios conformacionales en el enzima y el ligando en el momento de la unión.³³ En la actualidad se ha adoptado el concepto de conjuntos conformacionales. Éste se basa en que la estructura tridimensional viene representada por un conjunto de conformaciones interconvertibles, teniendo pues una importancia fundamental las conformaciones y el reconocimiento molecular en el establecimiento de las uniones.³⁴ Este mecanismo de acción implica un acoplamiento flexible y los métodos computacionales actuales permiten otorgar cierta flexibilidad al ligando. Sin embargo, dotar de esa flexibilidad al receptor presenta numerosas limitaciones. Existen algunos programas como AutoDock4 que permiten establecer algunos enlaces como giratorios (formados por los ligando y las cadenas laterales de los aminoácidos localizados en el sitio activo).³⁵ Otros programas como *Glide* permiten realizar una búsqueda de las distintas conformaciones obtenidas al unirse el ligando a los residuos durante el acoplamiento.³⁶

Los cálculos *docking* se pueden subdividir en dos partes, las cuales se encuentran relacionadas entre sí. El primer paso consiste en buscar las diferentes poses que puede adoptar el ligando mediante el uso de diferentes algoritmos y el segundo en el cálculo de las energías de unión para cada una de las poses mediante una función de *scoring*. Éstas, junto con los algoritmos de búsqueda, son el punto de divergencia entre los diferentes programas de *docking*. Los algoritmos más usuales son los no deterministas, o estocásticos, puesto que son los más eficientes en relación con el tiempo. Dentro de este grupo los más representativos son los de tipo MonteCarlo.³⁷ A partir del método MonteCarlo se generan las diferentes poses mediante la rotación de enlaces, la traslación o rotación del cuerpo rígido y para la obtención final de las poses se aplica la función de probabilidad de Boltzman. Una de las principales ventajas de este método es el poder realizar grandes modificaciones en el ligando, cosa que con Dinámica Molecular (DM) no se puede lograr.³⁸

Por otro lado, las funciones de *scoring* se encargan de determinar el modo de unión ligando-proteína y predecir la afinidad entre ambos.³⁹ Se diferencian tres tipos de función *scoring*:

- *Force field scoring function*: tiene en cuenta los parámetros físicos como interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, fuerzas de torsión o flexión de los enlaces. Cuenta con distintas contribuciones, por un lado, dos componentes energéticos de Lennard-Jones y un término que recoge el componente electrostático (Ecuación 1).⁴⁰

$$E = \sum_i \sum_j \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} + \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} + \frac{q_{ij}e_{ij}}{\epsilon(r_{ij})r_{ij}} \right)$$

Ecuación 1: Force field scoring function. r_{ij} distancia que separa un átomo de la proteína de uno del ligando, los términos A_{ij} y B_{ij} , hacen referencia a las interacciones del tipo Van Der Waals. q_{ij} y e_{ij} representan las cargas de los átomos de la proteína y el ligando y la constante dieléctrica, disolvente.

- *Empirical scoring function*: tiene en cuenta las interacciones iónicas, los enlaces de hidrógeno y las interacciones en la superficie de contacto entre la proteína y el ligando. Esta función es más sencilla y por ello los cálculos son más rápidos. *Glide* se basa en estas funciones (Ecuación 2).⁴¹

$$\Delta G = \sum_i W_i \Delta G_i$$

Ecuación 2: Empirical scoring function. ΔG_i representa el valor de energía obtenido de forma empírica. W_i hace referencia a los valores de energía de unión entre ligando y proteína obtenidos para complejos con estructura tridimensional conocida.

- *Knowledge-based scoring function*: se fundamenta en observaciones estadísticas del contacto entre proteína y ligando para grandes bases de datos de estructuras tridimensionales. Emplea una serie de potenciales estadísticos que dependen de la distancia ligando proteína.⁴²

5. Procedimiento experimental

Para llevar a cabo el cálculo de las interacciones ligando-proteína en primer lugar se ha de preparar la proteína (obtener la estructura minimizada para los cálculos). Después preparar los ligandos (generar todas las poses) y por último realizar el cálculo de interacción entre ligandos y enzimas. En nuestro caso se realizó bajo el protocolo *Glide*, con ambas enzimas con el fin de que los resultados obtenidos fueran comparables.

5.1. Preparación de la proteína

La estructura cristalográfica de la GalNAc-T2 se obtuvo del Protein Data Bank⁴³ desde su fichero PDB (4D0Z). Se obtuvo la forma cerrada que es la activa, la cual presenta UDP-5S.GalNAc como inhibidor. Por su parte la estructura de GalNAc-T3 la facilitó el Dr. Ramon Hurtado del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) de la Universidad de Zaragoza. Esta estructura también corresponde a la forma con el *Loop* cerrado.

Las estructuras originales presentan varias subunidades, cada una de ellas con un ligando y un ion Mn(II). También aparecen otras estructuras como sulfatos (SO₄)⁻² o moléculas de agua.

Tanto para la GalNAc-T2 como para la GalNAc-T3 se escogió la cadena A.

En primer lugar, se añadieron los residuos C y N terminales (*Cap termini*), mediante *EPIK* se generaron las cargas de los aminoácidos a pH fisiológico y se eliminaron las moléculas y cadenas no queridas.

Se llevó a cabo una minimización, bajo el campo de fuerza *OPLS_3*, en GalNAc-T2 con y sin ligando para ver si existían diferencias significativas.

Al comparar las estructuras de ambas se observó como las diferencias no eran significativas (Figura S1). Por ello se optó por llevar a cabo la minimización en ausencia del ligando.

5.2. Preparación de los ligandos

Las estructuras PDB de los ligandos se obtuvieron en dos pasos. En primer lugar, se dibujó su estructura 2D en *ChemDraw*; posteriormente, mediante *CORINA-3DModel* y el código *SMILE* se obtuvieron las estructuras tridimensionales de los ligandos que se grabaron en formato .pdb.

Los ficheros PDB generados se abrieron con *Maestro*, se asignaron los dobles enlaces y se añadieron los hidrógenos. La preparación de los ligandos se hizo mediante la herramienta *LigPrep*, de esta forma se generan los diferentes estados de protonación a pH fisiológico y se generan los conformeros. La minimización se también se realizó bajo el campo de fuerza *OPLS_3*, restringiendo la formación de diaestereoisómeros a 1.

5.3. Glide

Glide usa una serie de filtros jerárquicos para buscar las distintas posiciones de un ligando en un sitio de unión específico. Al receptor lo considera como una estructura rígida, a diferencia de lo que sucede en la realidad y permite la flexibilidad a los ligandos.

Para poder realizar el cálculo *Docking* se necesita definir el sitio de unión de la molécula o *Grid*, donde se estudien las interacciones de los diferentes conformeros de los ligandos con el enzima. Para definir el *Grid* se utilizó la función *Grid Generation* de *Maestro*. La definición del *Grid* pasa por generar una caja cúbica cuyas dimensiones se pueden variar, en este trabajo se definió una caja de 20Å, centrada en los residuos de His145, Arg362, Asp_176 y His_226 para la GalNAc-T2 y en la posición que ocupaba el ligando cristalino para GalNAc-T3. Una vez definido el *Grid* se lanzó el cálculo *Docking* con la opción cálculo extra preciso (XP).

6. Resultados y Discusión

La GalNAc-T2 y la GalNAc-T3 son dos isoenzimas, es decir que presentan dos secuencias proteicas diferentes, pero catalizan la misma reacción química. Las diferentes secuencias peptídicas pueden otorgar sitios catalíticos diferentes y que por ello la afinidad por los inhibidores sea diferente para ambas isoformas.

6.1. GalNAcT2 vs GalNAcT3

Mediante *CLC Sequence Viewer* se hizo un primer estudio comparativo de las secuencias lineales para obtener una primera aproximación a las diferencias entre las dos isoformas.

La GalNAc-T3 presenta una secuencia peptídica más larga que la GalNAc-T2, 663 aminoácidos para la isoforma T3 y 571 para la T2. Las secuencias peptídicas además de diferir en tamaño, difieren notablemente en los aminoácidos que componen la cadena. Sin embargo, los aminoácidos que coordinan al metal son equivalentes y se sitúan en la misma posición relativa para ambos péptidos. También coinciden los residuos de cisteína que conforman los puentes disulfuro que son fundamentales para la estructura tridimensional de la proteína (Figura 7).

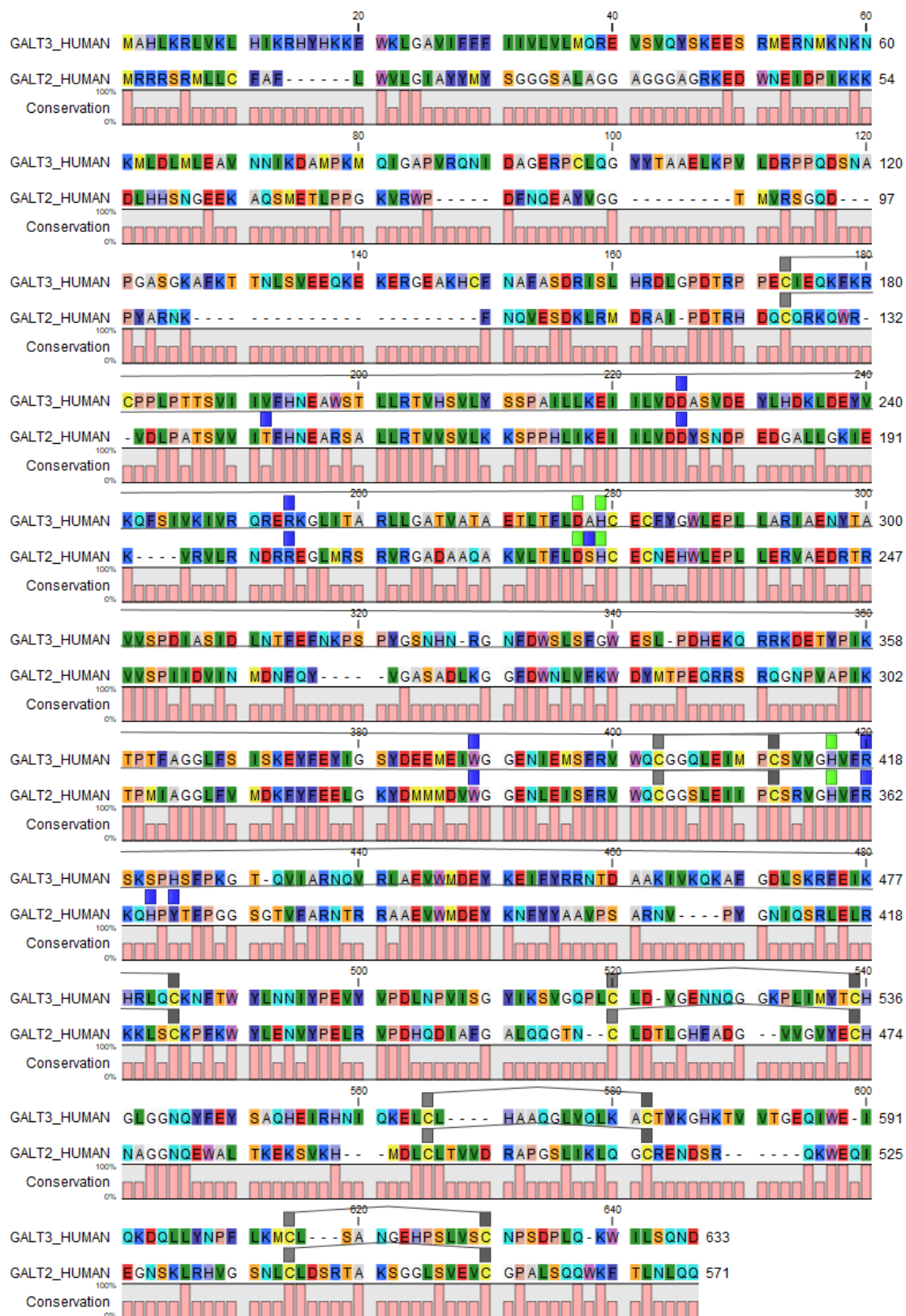


Figura 7: Comparación de la secuencia peptídica de GalNAc-T2 y GalNAc-T3. Sobre la secuencia de cada péptido se muestra en verde los residuos que coordinan al Mn^{2+} , en azul los que interaccionan con el ligando natural (sitio activo) y en gris las cisteínas que forman enlaces disulfuro en cada péptido.

En la comparación de los aminoácidos que interaccionan en el sitio activo, los que aparecen en la T3 aparecen en la T2, pero en la T2 aparecen algunos de forma exclusiva. Para obtener más información se realizó un *Docking* con el sustrato natural (**L5**) para los dos isoenzimas. El resultado muestra las siguientes energías de estabilización para cada enzima: E_{GalNAc-T2}: -14.578 kcal/mol y E_{GalNAc-T3}: -11.228 kcal/mol. Así pues, parece que el mayor número de aminoácidos que interaccionan en el sitio activo aumenta la afinidad por los ligandos.

Además, en la comparación (solo la cadena A) de los enzimas mediante Pymol se observó como la estructura tridimensional es equivalente para ambas, con el dominio catalítico N-terminal y el dominio tipo lectina C-terminal (Figura S2).

6.2. Ligandos diseñados

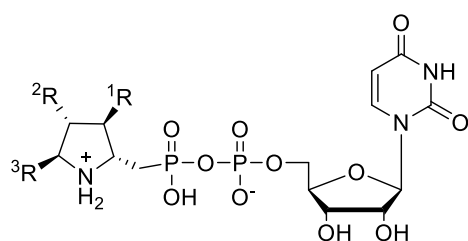
Para ambos isoenzimas se estudiaron los mismos ligandos. Siguiendo las líneas de investigación del grupo,¹⁸ se planteó el desarrollo de los ligandos bajo la siguiente estrategia.

Sustituir el anillo de azúcar por una pirrolidina, variando la funcionalización de la misma. Estas funcionalizaciones se corresponden con introducir dos tipos de sustituyentes distintos, para formar una pirrolidina di-, tri- o tetrasustituida:

- Grupos hidroxilo (OH) capaces de dar interacciones de tipo puente de hidrógeno en el sitio activo, de forma similar a la unidad de carbohidrato (Figura 8).
- Grupos benciloxi (OBn) que podrían dar lugar a interacciones hidrófobas, mediante la formación de enlaces tipo π - π (π *stacking*) o similares (Figura 8).

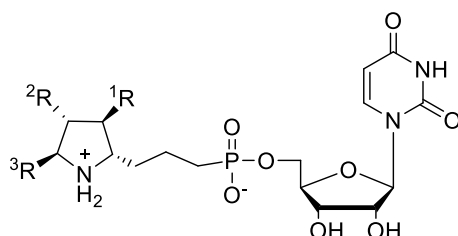
También se buscó variar la polaridad global de la molécula modificando el *linker*. El difosfato otorga más grupos para interaccionar (Figura 8a). Por otro lado, el *linker* más apolar puede otorgar una mayor flexibilidad al ligando lo que puede permitir que este se acomode mejor al sitio activo (Figura 8b).

a)



- ¹R:OBn; ²R:OBn; ³R:OBn. **1**
¹R:OH; ²R:OH; ³R:OH. **2**
¹R:OBn; ²R:OBn; ³R:H. **3**
¹R:OH; ²R:OH; ³R:H. **4**
¹R:OBn; ²R:H; ³R:H. **5**
¹R:OH; ²R:H; ³R:H. **6**

b)



- ¹R:OBn; ²R:OBn; ³R:OBn. **7**
¹R:OH; ²R:OH; ³R:OH. **8**
¹R:OBn; ²R:OBn; ³R:H. **9**
¹R:OH; ²R:OH; ³R:H. **10**
¹R:OBn; ²R:H; ³R:H. **11**
¹R:OH; ²R:H; ³R:H. **12**

Figura 8: Ligandos diseñados. 8a: pirofosfato. 8b: fosfonato y cadena alifática

Además de estos ligandos también se incorporaron a los cálculos aquellos con los que se llevó a cabo la cristalización de la proteína y el sustrato natural (**L5**), con el fin de utilizarlos como referencia para el resto, es decir, 5S-UDP GalNac (**13**) para GalNac-T2 y UDP (**14**) para GalNac-T3 (Figura 9).

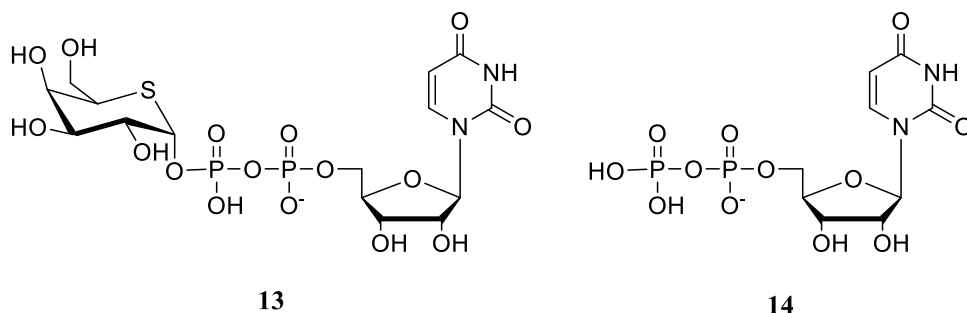


Figura 9: Ligandos usados en la cristalización de las proteínas.

6.3. Docking GalNac-T2.

Los cálculos de *docking* nos permiten cuantificar la energía de estabilización enzima-ligando mediante el valor de *docking score*. Este resulta de evaluar las interacciones favorables y desfavorables que sufre el ligando en el enzima.

Esto da lugar a que algunos ligandos voluminosos dispongan sus sustituyentes hacia el exterior del sitio activo, de forma que no aporten ninguna interacción adicional a las establecidas para el sustrato natural, y por consiguiente comprometiendo su actividad.

Por ello, en primer lugar, se estudió la disposición de los ligandos respecto al ligando **13** en el interior del enzima con el objetivo de encontrar algún ligando que tuviese grupos funcionales sin valor en la interacción.

En los ligandos **1** y **7** el grupo bencilo extra de ambos presenta muy pocos aminoácidos a su alrededor. Con los tres grupos bencilos, el ligando es tan voluminoso que no es capaz de unirse en el sitio activo y dispone uno de sus grupos bencilos en el exterior del enzima (Figura 10).

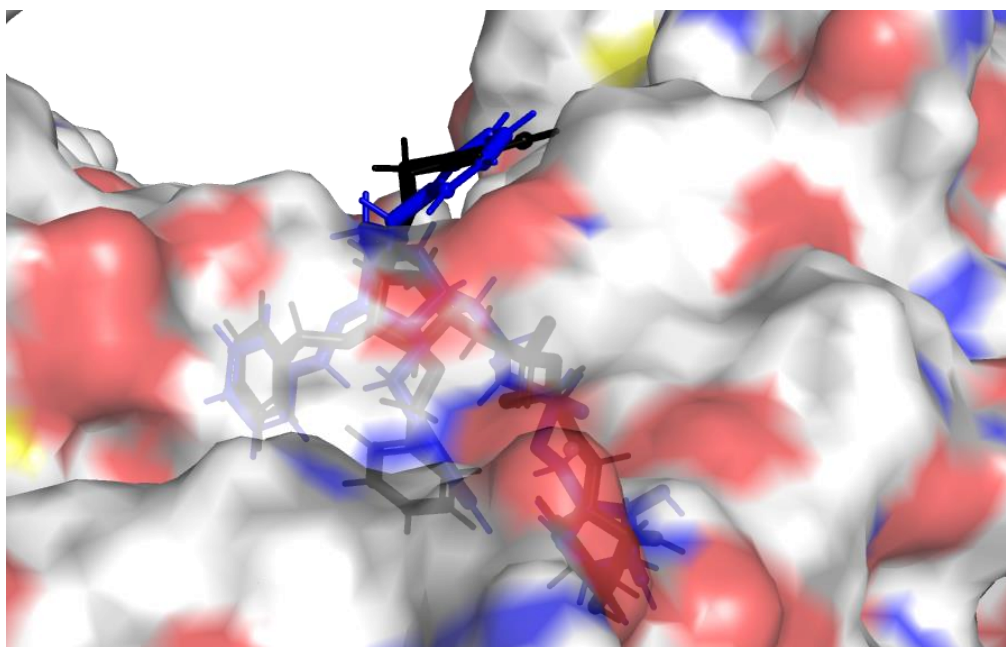


Figura 10: Grupos Bencilo de los ligandos **1** (negro) y **7** (azul)

Los mejores valores de *docking score* asociados a las diferentes poses de los ligandos se recogen en la Tabla 1 (eliminadas las poses asociadas al ligando **1** y **7**).

Tabla 1. Valores de *docking score* (kcal/mol) asociadas a las diferentes poses de los ligandos en GalNAc-T2

Ligando	D. Score	Ligando	D. Score	Ligando	D. Score	Ligando	D. Score
5	-15.252	L5	-14.420	L5	-13.627	9	-13.205
11	-15.005	9	-14.342	5	-13.609	L5	-13.159
3	-14.903	12	-13.997	2	-13.486	2	-13.144
10	-14.681	8	-13.984	11	-13.455	11	-13.137
L5	-14.578	8	-13.708	4	-13.416	L5	-13.081
11	-14.485	5	-13.685	L5	-13.288	L5	-13.067

A partir de estos resultados, se buscaron interacciones entre los residuos que conforman el sitio activo y los grupos funcionales del ligando que justifiquen y expliquen los diferentes valores de *docking score*. El conocer los aminoácidos implicados ayudará a posteriores diseños de ligandos enzimáticos y en nuestro caso concreto también para comparar frente a la GalNAc-T3. Todos los aminoácidos implicados en las interacciones de la GalNAc-T2 se pueden agrupar con el estudio de los ligandos **8, 9 y 13** (Tabla 2).

Tabla 2. Relación entre aminoácidos (GalNAc-T2) del sitio activo con los ligandos que interaccionan. Las casillas marcadas con la x indican que existe interacción.

<i>Ligandos</i> <i>Aa</i>	13	L5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mn	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Arg201	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Asp176	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Thr143	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
His145	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Ser225	x	x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x
Arg362	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Trp331	x	x						x						
Gly309	x					x								
Asp224	x					x							x	x
Arg208	x					x				x		x		
Glu334	x					x				x		x	x	x
Gly332	x									x				x
Ala307										x				x
Phe361									x		x	x		
Phe377					x				x		x	x		
His359									x		x	x		

Para el estudio de las interacciones se analizaron en tres partes: la correspondiente al azúcar o la pirrolidina, el *linker* y la uridina. En la descripción de las interacciones nos centramos en las más importantes: los puentes salinos (interacciones iónicas), las interacciones entre el metal y los ligandos, las interacciones tipo π -stacking, catión- π y los enlaces de hidrógeno. Para el análisis de estas interacciones se diferenció también entre si suceden con las cadenas laterales de los aminoácidos o con el esqueleto peptídico.

Ligando 13

Es el ligando que más interacciones tiene con el sitio activo:

- Uridina: El NH interno de la cadena lateral del residuo de ARG_201 con el C¹³=O de la uridina. El O⁻ Asp176 forma un enlace de hidrógeno con el grupo NH del uracilo. Thr143 interacciona por partida doble, por un lado, el grupo OH de su cadena lateral con el C¹⁴=O del uracilo y el C=O del esqueleto peptídico con un OH (C⁹) de la ribosa. Este grupo OH también forma un enlace de hidrogeno con el NH peptídico de la His145. El OH del C⁸ forma un enlace de hidrogeno con el grupo OH de la Ser225 (Tabla S1) (Figura 11 y S5).
- Difosfato: forma dos enlaces de hidrógeno, el grupo NH₂⁺ de Arg362 con un P=O y el NH del Trp331 con un P-O⁻.
Por último, el centro metálico de Mn(II) coordina a los dos P=O del difosfato (Tabla S1) (Figura 11 y S5).
- 5-S-GalNAc: como homólogo de un azúcar (glicomimético) presenta una gran cantidad de grupos OH que pueden establecer enlaces de hidrógeno.
El NH peptídico de la Gly309 con el grupo NH del NHAc (C⁴), también interacciona con este grupo NH el O⁻ del Asp224.
El Asp224 también forma un enlace de hidrógeno con el grupo OH del C³. El NH₂⁺ de la Arg208 forma un enlace de hidrógeno con este grupo OH.
El Glu334 otorga dos enlaces de hidrógeno, mediante el O⁻ de la cadena lateral y con el C=O peptídico, ambos con el OH del C¹. Este OH también interacciona con el NH peptídico del residuo de Gly332 (Tabla S1) (Figura 11 y S5).

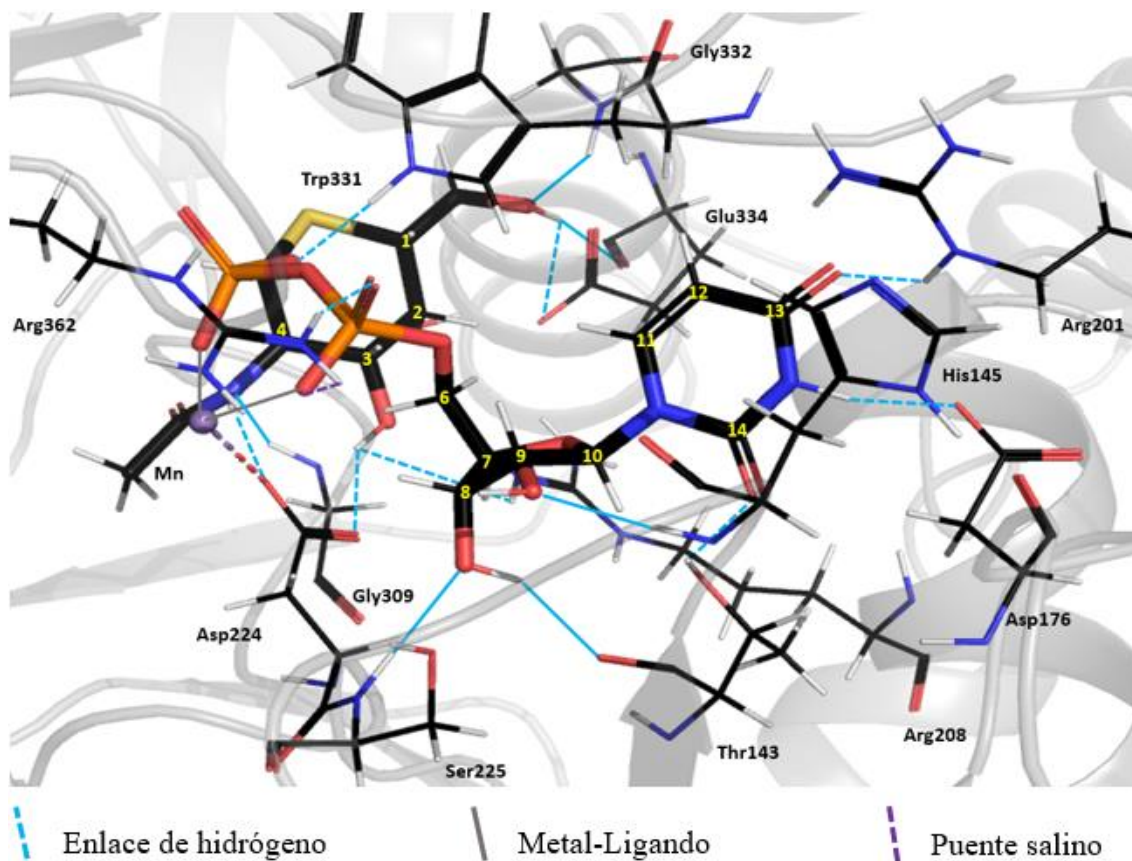


Figura 11: Interacciones 3D entre el **13** y el sitio activo del enzima. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

Ligando 8

- Uridina: las interacciones de la uridina se mantienen prácticamente constantes frente al ligando cristalino, la única diferencia es que desaparece la interacción con el residuo de His145 (Tabla S10) (Figura 12 y S14).
- Puente: aquí sí que se pueden apreciar algunas variaciones más frente al ligando **13**. En primer lugar, desaparece la interacción con el residuo de Trp331, además, aunque sí que interacciona con el residuo de Arg362, este lo hace en menor medida que con el 5S-NacGalNAc, ya que se pierde la contribución por puente salino. También varía la interacción con el centro metálico, en este caso interacciona con los dos O del grupo fosfato del *linker* (O-P=O) (Tabla S10) (Figura 12 y S14).
- Pirrolidina: El número de interacciones para la pirrolidina cae drásticamente frente al glicomimético. Desaparecen las interacciones de los residuos de Gly309, Asp224 y Gly332.

Los residuos de Arg208, Glu334 siguen existiendo, pero para este ligando las interacciones se suceden con el OH del C².

Aparece dos interacciones nuevas, en primer lugar, el residuo de Glu334 forma un puente salino con el NH₂⁺, que se origina a pH fisiológico, de la pirrolidina. Por otro lado, aparece un nuevo residuo, la Ala307 que forma un enlace de hidrógeno mediante el C=O peptídico con el OH del C¹ (Tabla S10) (Figura 12 y S14).

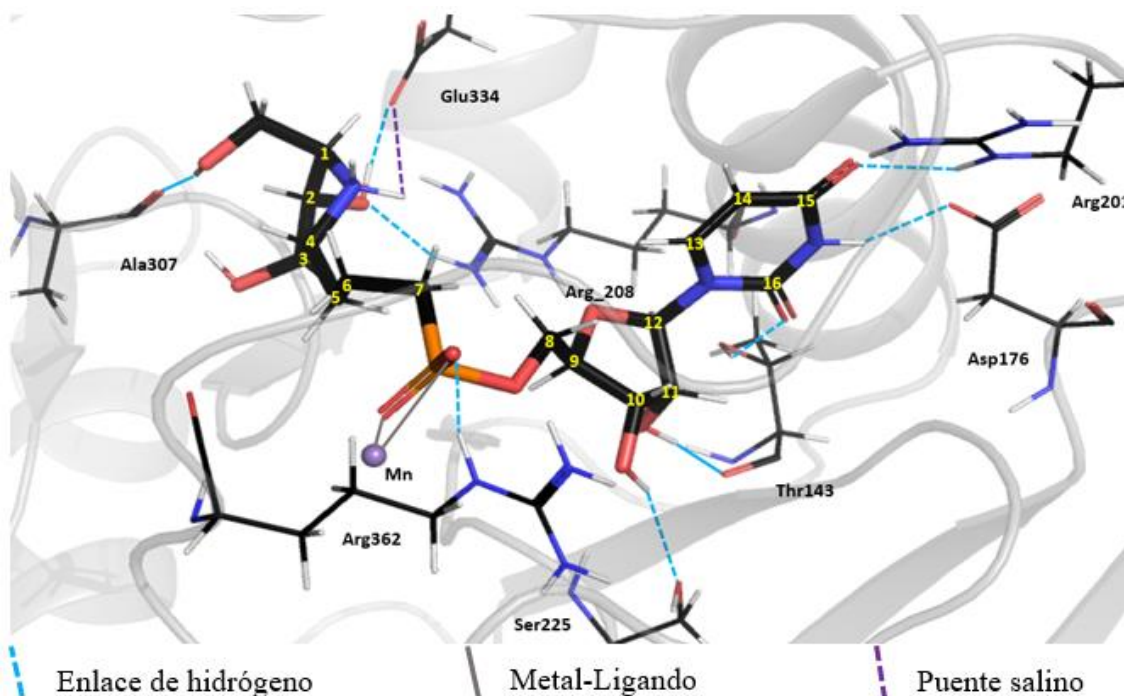


Figura 12: Interacciones 3D entre el ligando **8** y el sitio activo del enzima. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

Ligando 9

El ligando **9** presenta dos posiciones con grupos bencilo, por lo que es susceptible de dar interacciones tipo π - π .

- Uridina: para el ligando **9** se pueden observar las mismas interacciones que en el ligando natural con todos los aminoácidos salvo que, como en el ligando **8**, no aparece la interacción por parte de las His145. A diferencia de casos anteriores aquí el residuo de Arg362 interacciona también con la ribosa, concretamente su NH₂⁺ con el grupo OH del C¹⁰ (Tabla S11) (Figura 13 y S15).

- *Linker*: son idénticas a las del caso del ligando **8**. (Tabla S11) (Figura 13 y S15)
- Pirrolidina: para el ligando **9** la pirrolidina presenta unas interacciones totalmente novedosas. El grupo aromático del OBn del C² forma una interacción tipo π - π con el grupo aromático de la Phe377. De forma equivalente el segundo grupo bencilo presente en la pirrolidina forma dos interacciones tipo π - π por ambas caras del plano, con la Phe361 y la His359 (Tabla S11) (Figura 13 y S15).

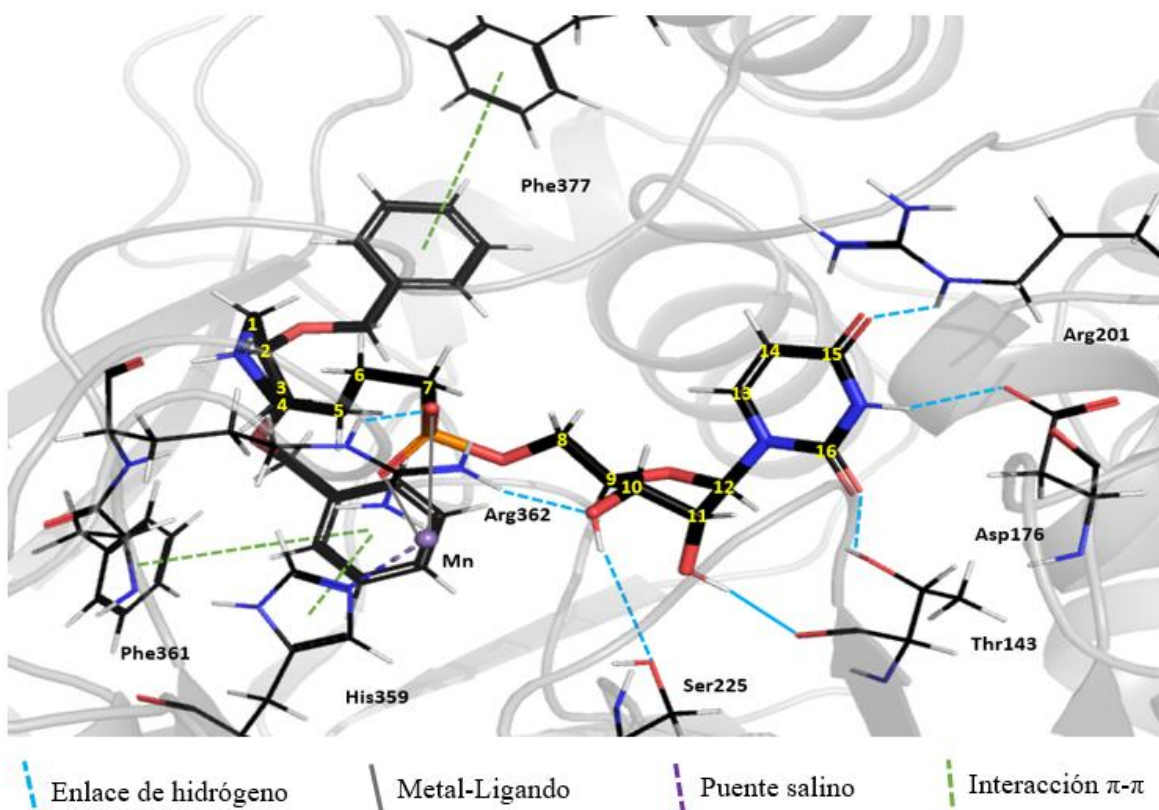


Figura 13: Interacciones 3D entre el ligando **17** y el sitio activo del enzima. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

Además de las interacciones más comunes de los aminoácidos que componen el sitio activo, en algunos casos aparecen algunas particularidades. Entre ellas destacan las asociadas a la interacción entre el difosfato de los ligandos y el Mn y la Arg362. El centro metálico se coordina con hasta tres átomos de oxígeno, la Arg362, por su parte, forma hasta una triple interacción por medio de sus tres grupos amino (Figuras S29-32).

En el caso de los ligandos que presentan el difosfato, se observa que cuando los sustituyentes de la pirrolidina son OBn el número de interacciones decrecen en el *linker* frente a las pirrolidinas hidroxiladas. Esto puede deberse a que la presencia de grupos

voluminosos condiciona la disposición del ligando en el sitio activo, perdiendo interacciones en el *linker* en pro de ganarlas en la pirrolidina. Para los ligandos con el *linker* más apolar parece que la flexibilidad que le otorga la cadena alifática ayuda a disponer el sustrato en el sitio activo.

En general, las interacciones que sufre la uridina son bastante constantes para todos los ligandos, debido a que es el centro de reconocimiento específico de los enzimas.

Por parte de las pirrolidinas existe también una clara diferencia entre las pirrolidinas sustituidas con grupos OBn o grupos OH. Como era previsible, las pirrolidinas sustituidas por grupos benziloxy presentan una alta tendencia a interactuar con residuos aromáticos mientras que las polihidroxiladas lo hacen con residuos con cadenas laterales polares (Tabla 2).

En las pirrolidinas benciladas se observa una mayor interacción, debido a la existencia de un bolsillo hidrofóbico en el sitio activo, el cual presenta una gran afinidad por grupos aromáticos. Sin embargo, dan mejor *docking score* cuando solo hay un grupo aromático. Esto se debe a que el sitio activo es reducido y muchos grupos aromáticos son demasiado voluminosos para disponerse en el interior del enzima (Figura S3).

Se han obtenido ligandos que otorgan mejores *docking score* que el propio azúcar natural, aunque dentro del orden de magnitud, lo que es interesante para lograr una inhibición competitiva que module la actividad enzimática.

Por último, destacar que no necesariamente un mayor número de interacciones significa una mayor estabilización (la mejor *docking score* la obtiene el ligando **5**) ya que también dependerá de la fortaleza de las mismas. Existen otros factores como las repulsiones dentro del sitio activo que contribuyen desfavorablemente al modo de unión.

6.4. Docking GalNAc-T3.

La metodología que se siguió es la misma que para el caso de la isoforma T2. En la primera comparación de la disposición tridimensional de los ligandos se observó cómo, los ligandos **4**, **5** y **6** se disponían rotados 180° en el sitio activo con respecto al ligando **14** (Figura 14).

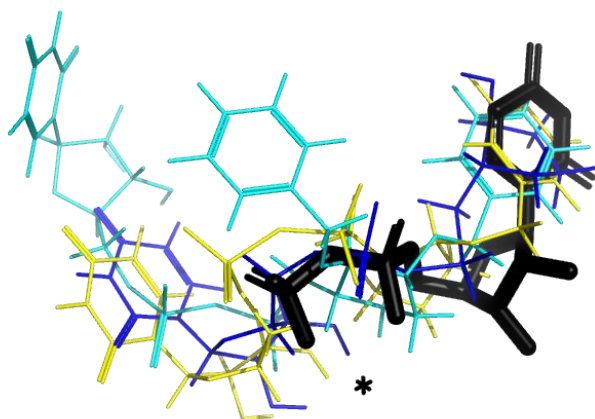


Figura 14: comparativa entre los ligandos **3**, **5**, **6** y **14**. Negro (**14**), cian (**3**), amarillo (**5**) y azul (**6**).

Asimismo, los ligandos **7** y **10** disponían la base nitrogenada en posiciones diferentes a las del ligando **14**. Siendo la uridina la zona de reconocimiento de los enzimas estos ligandos presentan una orientación inadecuada (Figura 15).

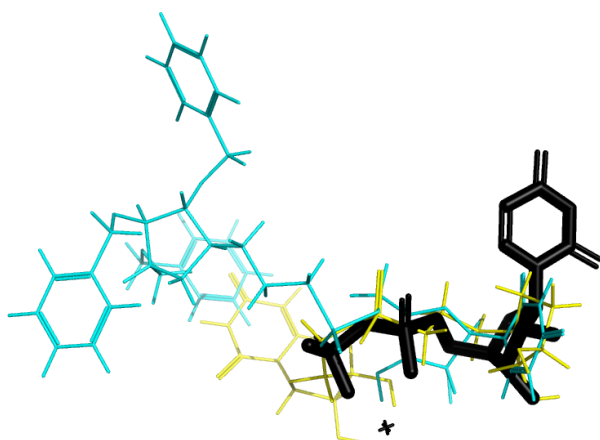


Figura 15: comparativa entre los ligandos **7**, **10** y **13**. Negro (**14**), cian (**7**) y amarillo (**10**).

En el caso particular del ligando **7**, dos de los sustituyentes bencílicos se disponen fuera del sitio activo, de manera equivalente que sucedía con GalNAc-T2 (Figura S4).

En principio, estos ligandos no son buenos candidatos para su síntesis experimental. Sin embargo, se estudiaron las interacciones de los ligandos **7** y **10** para conocer si algunas de estas pudiesen ser interesantes en el diseño de nuevos inhibidores (introducción estratégica de grupos funcionales en las pirrolidinas para lograr interacciones adicionales).

Las mejores *docking scores* asociadas a las diferentes poses de los ligandos (excluyendo los ligandos **3**, **5** y **6**) se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de *docking Score* (kcal/mol) asociadas a las diferentes poses de los ligandos en GalNAc-T3

Ligando	D. Score	Ligando	D. Score	Ligando	D. Score	Ligando	D. Score
2	-11.350	8	-10.262	L5	-9.141	8	-8.831
L5	-11.228	L5	-10.162	8	-9.132	9	-8.743
L5	-11.145	11	-9.456	9	-9.130	4	-8.707
L5	-10.824	11	-9.411	9	-9.106	4	-8.608
2	-10.559	L5	-9.241	9	-9.104	L5	-8.556
L5	-10.314	L5	-9.241	8	-8.843	8	-8.530

Todos los aminoácidos implicados en las interacciones de la GalNAc-T3 se pueden agrupar con el estudio de los ligandos **14**, **9** y **2** (Tabla 2). De igual manera que para la GalNAc-T2, hay que tener en cuenta no solo son los aminoácidos, sino también el tipo de interacción que sufren.

Tabla 4. Relación entre aminoácidos (GalNAc-T2) del sitio activo con los ligandos que interaccionan. Las casillas marcadas con la x indican que existe interacción.

ligandos Aa	14	1	2	4	7	8	9	11	12
Mn	x	x	x						x
His431	x								
Arg416	x	x	x	x	x	x		x	x
Trp385	x		x	x			x		
Ala276	x		x					x	
His192	x		x		x				
His421	x		x					x	
Arg252	x	x	x	x		x	x	x	x
Asp275					x	x		x	
Val190			x			x		x	
Ala361			x			x		x	
Asp223			x	x		x	x		
Trp337									
Arg259			x						
Glu388			x						

Ligando 14

- Uridina: forma hasta cuatro enlaces de hidrogeno, $C^{13}=O$ con dos grupos NH de Arg252. El NH peptídico de la His192 con el OH del C^9 y el NH peptídico Ala276 con el otro OH de la ribosa (Tabla S15) (Figura 16 y S19).
- Difosfato: Se forman 3 enlaces de hidrogeno entre los oxígenos del difosfato y los residuos de His421, His431 y Trp385. El grupo NH_2^+ de la Arg416 forma un puente salino con los dos O^- del difosfato. Por último, el Mn(II) coordina a los dos O^- del difosfato (Tabla S15) (Figura 16 y S19).

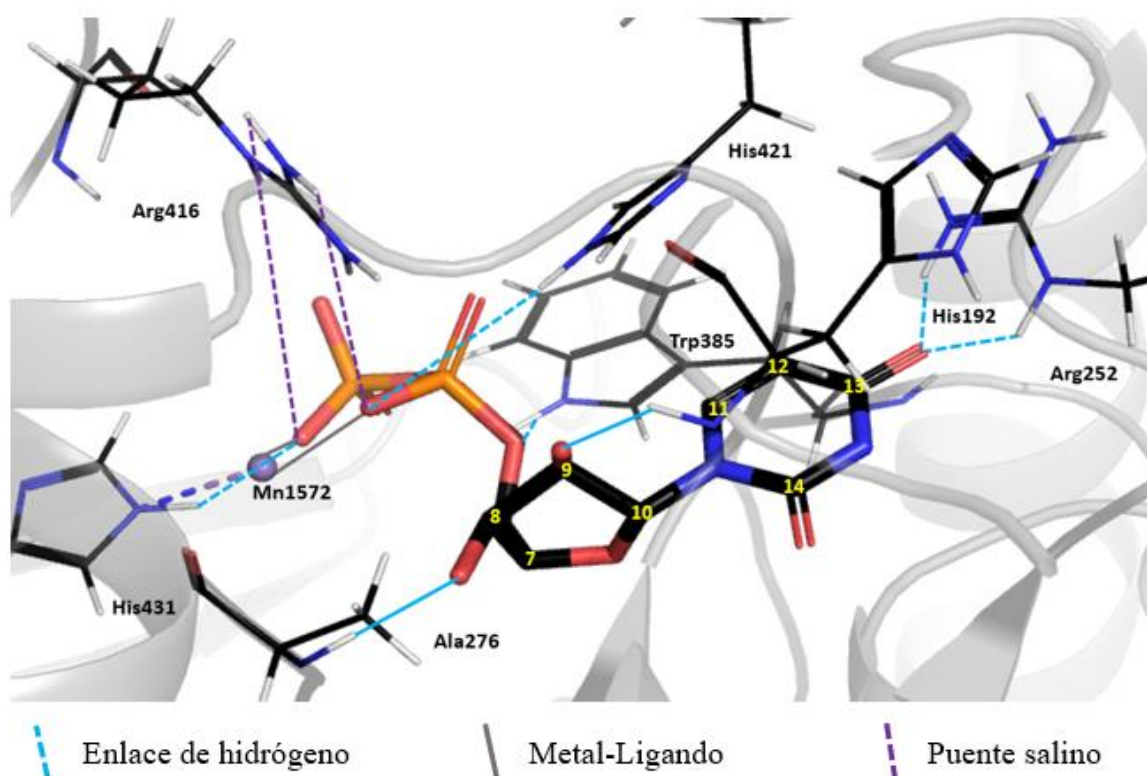


Figura 16: Interacciones 3D entre el ligando cristalino y el sitio activo del enzima. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

Ligando 9

- Uridina: el número de interacciones se reduce considerablemente, aunque aparecen dos nuevas: el Asp223 forma un enlace con el NH del uracilo y el OH del C con el $C=O$ peptídico de la Val190. Se mantiene la interacción con el residuo de Arg252 (Tabla S25) (Figura 17 y S25).

- *Linker*: mantiene la interacción con el residuo de Arg416, aunque en este caso de diferente forma que para el ligando **14**. El grupo NH_2^+ de la cadena lateral forma un enlace de hidrogeno y un puente salino (Tabla S25) (Figura 17 y S25).
- Pirrolidina: la pirrolidina da dos interacciones, por un lado, el O^- del Asp275 forma un puente salino con el NH_2^+ que se forma en la pirrolidina a pH fisiológico. Por otro lado, la presencia de grupos aromáticos permite la formación de una interacción tipo π - π entre el OBn del C^2 y el grupo aromático del Trp337 (Tabla S25) (Figura 17 y S25).

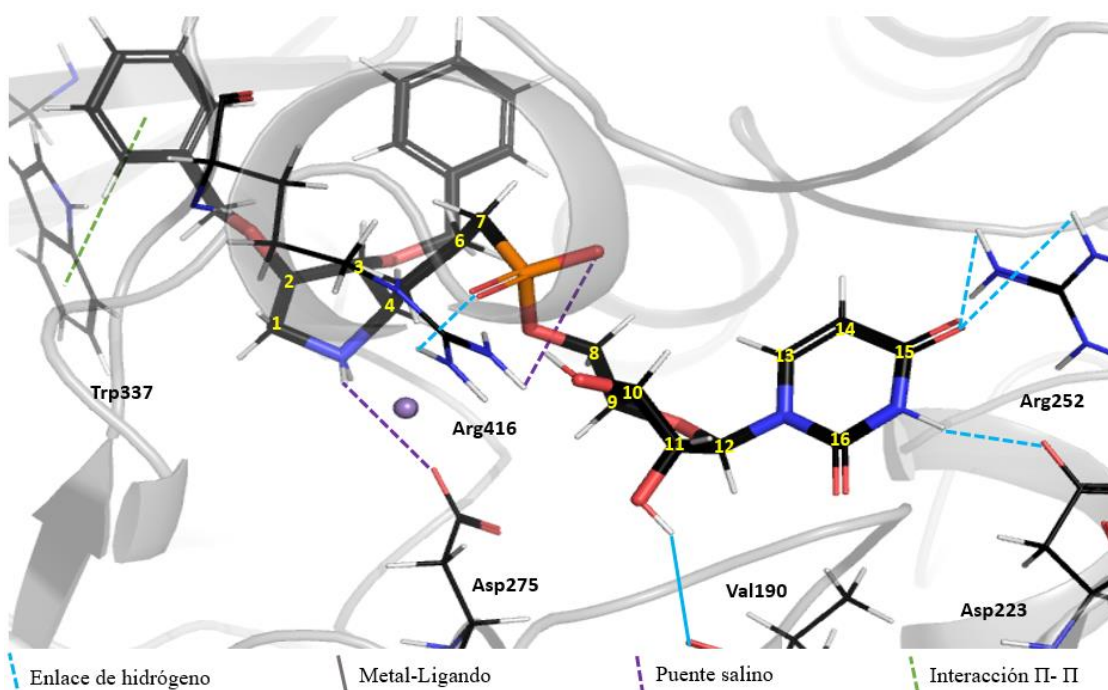


Figura 17: Interacciones 3D entre el ligando **9** y el sitio activo del enzima. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico.

Ligando 2

El ligando **2** es el ligando que mayor número de interacciones otorga.

- Uridina: Las interacciones por parte de los residuos de His192 y Ala276 se mantienen constantes al ligando cristalino. La interacción por parte de la Val190 y Asp223 se mantiene equivalente al ligando **17**. En este caso la Arg252 solo forma una interacción con el $\text{C}=\text{O}$ del C^{13} (Tabla S17) (Figura 18 y S21).
- Difosfato: se mantiene constante respecto al cristal la interacción con la His421. También interacciona con la Arg416, pero de una forma distinta. En este caso solo

forma un puente salino con uno de los O⁻ de los fosfatos. Algo similar que lo que se observa con el Trp385, que interacciona con otro oxígeno del difosfato.

El ión Mn(II) coordina a los dos O⁻ de ambos fosfatos (Tabla S17) (Figura 18 y S21).

- Pirrolidina: debido a los tres grupos OH el ligando **2** tiene tendencia a formar enlaces de hidrogeno. El grupo OH del C³ forma dos enlaces de hidrogeno, con el C=O peptídico de la Ala361 y con el NH₂⁺ de la Arg259. El grupo OH del C⁴ también forma dos enlaces de hidrogeno, ambos con el Glu388, con el O⁻ de la cadena lateral y con el NH peptídico (Tabla S17) (Figura 18 y S21).

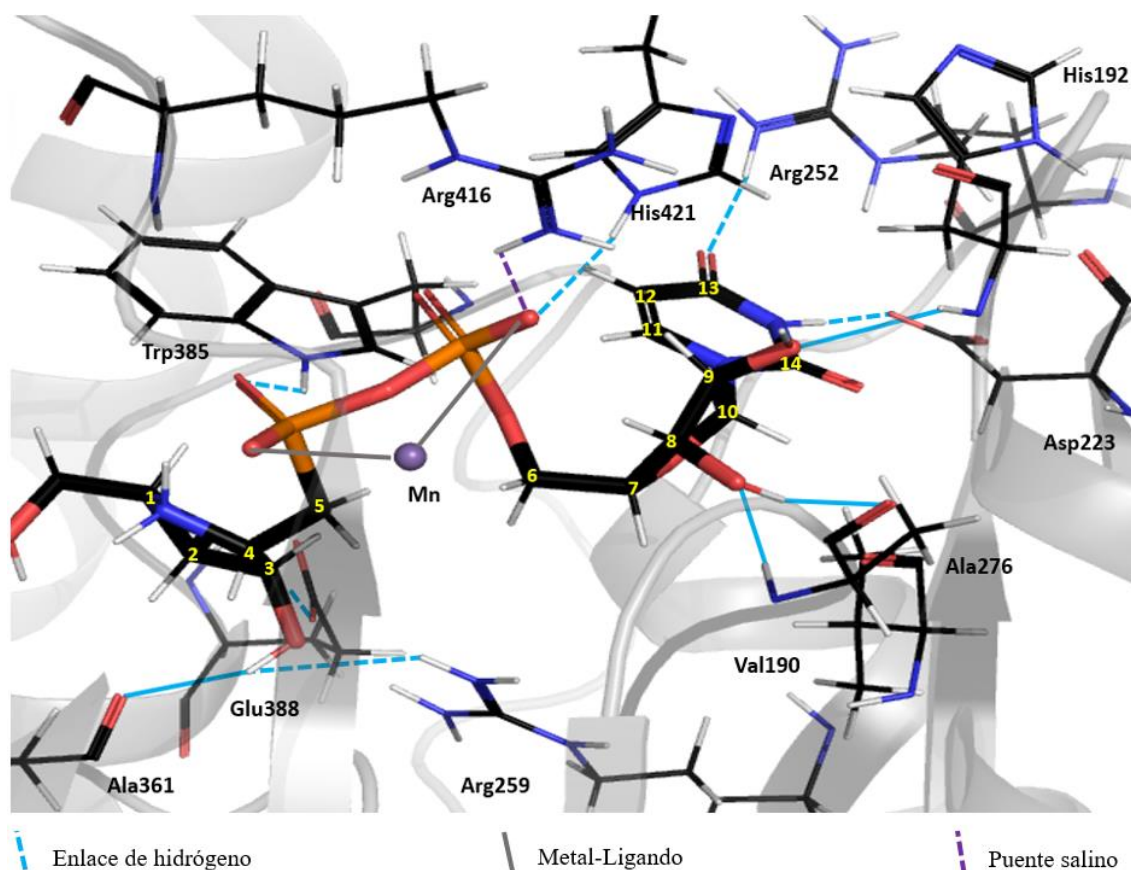


Figura 18: Interacciones 3D entre el ligando **2** y el sitio activo del enzima. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico.

Además de las principales interacciones descritas anteriormente se observaron otras interacciones como las de tipo catión- π entre la uridina del ligando **7** y el grupo NH₂⁺ de la Arg416 (Figura S35), o tipo π - π con el uracilo del ligando **12** y el residuo de His421 (Figura S43). Las interacciones de las uridinas presentan de forma prácticamente constante las interacciones con los residuos de Arg252 y Asp223, siendo también muy

recurrente la interacción con el C=O de la cadena peptídica de la Val190 para los ligandos que obtienen mejores *docking score*. Para el caso de la GalNAc-T3 se observa una clara tendencia a las pirrolidinas polihidroxiladas, el *docking score* asociado es muy superior cuando hay grupos OHs que cuando hay grupos aromáticos, lo que parece indicar que el sitio activo de la GalNAc-T3 es reducido y los grupos bencilo no tienen cabida en él. Debido a esta poca tendencia hacia sustituyentes voluminosos los ligandos no precisan de una flexibilidad muy elevada para disponerse en el sitio activo, por lo que prefieren las interacciones a que da lugar el difosfato antes que buscar un mayor número de interacciones para la pirrolidina.

De igual manera que para el caso anterior se ha obtenido un ligando que, a nivel teórico, supera el *binding* con el enzima que presenta el ligando natural y que por consiguiente se postula como un buen candidato a la síntesis experimental.

6.5. Comparativa docking GalNAc-T2 y GalNAc-T3.

Las uridinas presentan bastantes interacciones homologas entre las dos isoformas con residuos como la Arg (201 para GalNAc T2 y 252 para T3), el Asp (176 para T2 y 223 para T3) o la histidina (145 para T2 y 192 para T3). Las tendencias de ambas isoformas son casi opuestas en lo referente a la sustitución de la pirrolidinas, la GalNAc-T2 presenta una mayor afinidad por las pirrolidinas benciladas. Esto se debe a la existencia de un bolsillo hidrófobo en el sitio activo que ve muy favorecido la inclusión de un grupo aromático en su interior.

Por su parte, la GalNAc-T3 prefiere las pirrolidinas polihidroxiladas, principalmente porque parece ser que su sitio activo es más reducido que en la T2, a pesar de su mayor número de aminoácidos.

En cuanto a la preferencia por el *linker*, ambas isoformas prefieren el *linker* más polar puesto que da lugar a un mayor número de interacciones. Sin embargo, en el caso de la T2, cuando el ligando presenta una pirrolidina muy voluminosa se favorece el *linker* flexible ya que otorga mayor libertad conformacional al ligando.

7. Conclusiones

Se han desarrollado ligandos con capacidades de unión con el enzima elevadas, en ocasiones superiores a las del sustrato natural, que hace de aquéllos potenciales candidatos a ser moduladores de las GalNAc-T2 y GalNAc-T3.

En el estudio de la isoforma T2 se observó la existencia de un bolsillo hidrófobo que tiene afinidad por los grupos aromáticos. Sin embargo, la incorporación de demasiados grupos aromáticos a los ligandos hace que estas moléculas sean incapaces de localizarse en el sitio activo en el enzima. Por ello el mejor ligando para la isoforma T2 es aquel que solo presenta una pirrolidina bencilada unida por un grupo difosfato a la uridina (**5**). Su homólogo con el linker más apolar (**11**) también da lugar a buenos valores de *docking score*.

En el estudio de la isoforma T3 se observó que no presentaba tal bolsillo hidrófobo y que por consiguiente presentaba mayor afinidad por las pirrolidinas hidroxiladas. En este caso cuantos más grupos hidroxilo mayor número de interacciones puede dar con los residuos del sitio activo y con ello mayor afinidad tendrá con ella. Por ello el mejor ligando para la isoforma T3 es aquel que presenta el *linker* polar y la pirrolidina con los tres grupos OH (**2**), de nuevo su homólogo más apolar (**8**) también da buenos resultados.

En conclusión, se han encontrado ligandos con interacciones equivalentes al sustrato natural para los dos enzimas estudiados, GalNAc-T2 y GalNAc-T3 lo que permite esperar una inhibición competitiva para dichos ligandos.

8. Bibliografía

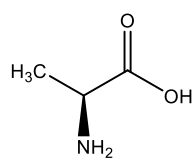
1. Crick, F., Central dogma of molecular biology. *Nature* **1970**, 227 (5258), 561-563.
2. Olson, M. V.; Varki, A., Sequencing the chimpanzee genome: Insights into human evolution and disease. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, 4 (1), 20-28.
3. Kellokumpu, S.; Hassinen, A.; Glumoff, T., Glycosyltransferase complexes in eukaryotes: long-known, prevalent but still unrecognized. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, 73 (2), 305-325.
4. Wang, S.; Shen, D. L.; Lafont, D.; Vercoutter-Edouart, A.-S.; Mortuaire, M.; Shi, Y.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A.; Lefebyre, T.; Pinto, B. M.; Vocadlo, D.; Vidal, S., Design of glycosyltransferase inhibitors targeting human O-GlcNAc transferase (OGT). *MedChemComm* **2014**, 5 (8), 1172-1178.
5. Wang, S.; Vidal, S., Recent design of glycosyltransferase inhibitors. *Carbohydr. Chem.* **2013**, 39, 78-101.
6. Ghirardello, M.; De Las Rivas, M.; Lacetera, A.; Delso, I.; Lira-Navarrete, E.; Tejero, T.; Martín-Santamaría, S.; Hurtado-Guerrero, R.; Merino, P., Glycomimetics Targeting Glycosyltransferases: Synthetic, Computational and Structural Studies of Less-Polar Conjugates. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22 (21), 7215-7224.
7. Albesa-Jové, D.; Mendoza, M. F.; Rodrigo-Unzueta, A.; Gomollón-Bel, F.; Cifuentes, J.; Urresti, S.; Comino, N.; Gómez, H.; Romero-García, J.; Lluch, J. M.; Sancho-Vaello, E.; Biarnés, X.; Planas, A.; Merino, P.; Masgrau, L.; Guerin, M. E., A Natural Ternary Complex Trapped in Crystal Reveals the Catalytic Mechanism of a Retaining Glycosyltransferase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 9898-9902.
8. Lazarus, M. B.; Jiang, J.; Gloster, T. M.; Zandberg, W. F.; Whitworth, G. E.; Vocadlo, D. J.; Walker, S., Structural snapshots of the reaction coordinate for O-GlcNAc transferase. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8 (12), 966-968.
9. Gomez, H.; Rojas, R.; Patel, D.; Tabak, L. A.; Lluch, J. M.; Masgrau, L., A computational and experimental study of O-glycosylation. Catalysis by human UDP-GalNAc polypeptide:GalNAc transferase-T2. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12 (17), 2645-2655.
10. Merino, P.; Delso, I.; Tejero, T.; Ghirardello, M.; Juste-Navarro, V., Nucleoside Diphosphate Sugar Analogues that Target Glycosyltransferases. *Asian Journal of Organic Chemistry* **2016**, 5 (12), 1413-1427.
11. Semba, R. D.; Huang, H.; Luttý, G. A.; Eyk, J. E.; Hart, G. W., The role of O-GlcNAc signaling in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Proteomics Clin. Appl.* **2014**, 8 (3-4), 218-231.
12. Yokota, S.; Ogawara, K.; Kimura, R.; Shimizu, F.; Baba, T.; Minakawa, Y.; Higo, M.; Kasamatsu, A.; Endo-sakamoto, Y.; Shiiba, M.; Tanzawa, H.; Uzawa, K., Protein O-fucosyltransferase 1: a potential diagnostic marker and therapeutic target for human oral cancer. *Int. J. Oncol.* **2013**, 43 (6), 1864-1870.
13. Reticker-Flynn, N. E.; Bhatia, S. N., Aberrant Glycosylation Promotes Lung Cancer Metastasis through Adhesion to Galectins in the Metastatic Niche. *Cancer Discov.* **2015**, 5 (2), 168-181.
14. Topaz, O.; Shurman, D. L.; Bergman, R.; Indelman, M.; Ratajczak, P.; Mizrachi, M.; Khamaysi, Z.; Behar, D.; Petronius, D.; Friedman, V.; Zelikovic, I.; Raimor, S.; Metzker, A.; Richard, G.; Sprecher, E., Mutations in GALNT3, encoding a protein involved in O-linked glycosylation, cause familial tumoral calcinosis. *Nat. Genet.* **2004**, 36 (6), 579-581.

15. Zhu, Y.; Shan, X.; Yuzwa, S. A.; Vocadlo, D. J., The emerging link between O-GlcNAc and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (50), 34472-34481.
16. Compain, P.; Martin, O. R., Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9* (12), 3077-3092.
17. Borodkin, V. S.; Schimpl, M.; Gundogdu, M.; Rafie, K.; Dorfmueller, H. C.; Robinson, D. A.; van Aalten, D. M. F., Bisubstrate UDP-peptide conjugates as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Biochem. J.* **2014**, *457* (3), 497-502.
18. Ghirardello, M.; Sádaba, D.; Delso, I.; Tejero, T.; Perrone, D.; Chinaglia, N.; Marchesi, E.; Fogagnolo, M.; Rafie, K.; van Aalten, D. M. F.; Merino, P., UDP-GlcNAc Analogues as Inhibitors of O-GlcNAc Transferase (OGT): Spectroscopic, Computational, and Biological Studies. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (28), 7264-7272.
19. Masuko, S.; Bera, S.; Green, D. E.; Weiwer, M.; Liu, J.; DeAngelis, P. L.; Linhardt, R. J., Chemoenzymic Synthesis of Uridine Diphosphate-GlcNAc and Uridine Diphosphate-GalNAc Analogs for the Preparation of Unnatural Glycosaminoglycans. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (3), 1449-1456.
20. Lira-Navarrete, E.; de las Rivas, M.; Companon, I.; Pallares, M. C.; Kong, Y.; Iglesias-Fernandez, J.; Bernardes, G. J. L.; Peregrina, J. M.; Rovira, C.; Bernado, P.; Bruscolini, P.; Clausen, H.; Lostao, A.; Corzana, F.; Hurtado-Guerrero, R., Dynamic interplay between catalytic and lectin domains of GalNAc-transferases modulates protein O-glycosylation. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6937.
21. Kalra, A. V.; Campbell, R. B., Mucin overexpression limits the effectiveness of 5-FU by reducing intracellular drug uptake and antineoplastic drug effects in pancreatic tumours. *Eur. J. Cancer* **2009**, *45* (1), 164-173.
22. Bennett, E. P.; Mandel, U.; Clausen, H.; Gerken, T. A.; Fritz, T. A.; Tabak, L. A., Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* **2012**, *22* (6), 736-56.
23. de las Rivas, M.; Coelho, H.; Diniz, A.; Lira-Navarrete, E.; Compañón, I.; Jiménez-Barbero, J.; Schjoldager, K. T.; Bennett, E. P.; Vakhrushev, S. Y.; Clausen, H.; Corzana, F.; Marcelo, F.; Hurtado-Guerrero, R., Structural Analysis of a GalNAc-T2 Mutant Reveals an Induced-Fit Catalytic Mechanism for GalNAc-Ts. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24* (33), 8382-8392.
24. Valero-Gonzalez, J.; Leonhard-Melief, C.; Lira-Navarrete, E.; Jimenez-Oses, G.; Hernandez-Ruiz, C.; Pallares, M. C.; Yruela, I.; Vasudevan, D.; Lostao, A.; Corzana, F.; Takeuchi, H.; Haltiwanger, R. S.; Hurtado-Guerrero, R., A proactive role of water molecules in acceptor recognition by protein O-fucosyltransferase 2. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (4), 240-246.
25. Gest, P.; Kaur, D.; Pham, H. T.; van der Woerd, M.; Hansen, E.; Brennan, P. J.; Jackson, M.; Guerin, M. E., Preliminary crystallographic analysis of GpgS, a key glucosyltransferase involved in methylglucose lipopolysaccharide biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **2008**, *64*, 1121-1124.
26. Prieto, L.; Juste-Navarro, V.; Uriá, U.; Delso, I.; Reyes, E.; Tejero, T.; Carrillo, L.; Merino, P.; Vicario, J. L., Regioselectivity Change in the Organocatalytic Enantioselective (3+2) Cycloaddition with Nitrones through Cooperative Hydrogen-Bonding Catalysis/Iminium Activation. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23* (12), 2764-2768.

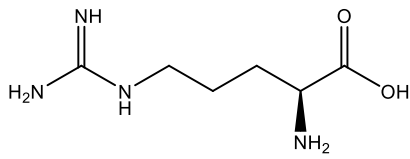
27. Marqués-López, E.; Herrera, R. P., (Thio)urea-catalyzed formation of heterocyclic compounds. In *Targets in Heterocyclic Systems*, 2014; Vol. 18, pp 236-261.
28. Delso, I.; Tejero, T.; Goti, A.; Merino, P., Synthesis of d-arabinose-derived polyhydroxylated pyrrolidine, indolizidine and pyrrolizidine alkaloids. Total synthesis of hyacinthacine A 2. *Tetrahedron* **2010**, 66 (6), 1220-1227.
29. Schrödinger <https://www.schrodinger.com/maestro> (accessed june 25, 2019).
30. OmicX <https://omictools.com/clc-sequence-viewer-tool> (accessed june 25, 2019).
31. Computerchemie, M. N. G. https://www.mn-am.com/online_demos/corina_demo (accessed june 25, 2019).
32. PerkinElmer. <https://www.perkinelmer.com/es/category/chemdraw> (accessed june 25, 2019).
33. Koshland, D. E., The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, 33 (23-24), 2375-2378.
34. Karush, F., Heterogeneity of the Binding Sites of Bovine Serum Albumin. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, 72 (6), 2705-2713.
35. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Huey, R.; Olson, A. J., Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: Parallel applications of AutoDock 2.4. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, 10 (4), 293-304.
36. Friesner, R. A.; Banks, J. L.; Murphy, R. B.; Halgren, T. A.; Klicic, J. J.; Mainz, D. T.; Repasky, M. P.; Knoll, E. H.; Shelley, M.; Perry, J. K.; Shaw, D. E.; Francis, P.; Shenkin, P. S., Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.* **2004**, 47 (7), 1739-1749.
37. Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M., Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2011**, 7 (2), 146-157.
38. Hart, T. N.; Read, R. J., A multiple-start Monte Carlo docking method. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **1992**, 13 (3), 206-222.
39. Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J., Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19 (14), 1639-1662.
40. Huang, N.; Kalyanaraman, C.; Bernacki, K.; Jacobson, M. P., Molecular mechanics methods for predicting protein-ligand binding. *PCCP* **2006**, 8 (44), 5166-5177.
41. Böhm, H. J., The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1994**, 8 (3), 243-256.
42. Verkhivker, G.; Appelt, K.; Freer, S. T.; Villafranca, J. E., Empirical free energy calculations of ligand-protein crystallographic complexes. I. Knowledge-based ligand-protein interaction potentials applied to the prediction of human immunodeficiency virus 1 protease binding affinity. *Protein Eng., Des. Sel.* **1995**, 8 (7), 677-691.
43. RCSB PDB. <http://www.rcsb.org/> (accessed june 25, 2019).

9. Anexos

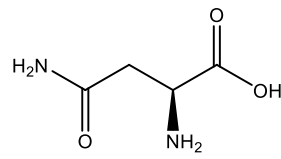
9.1. Estructura, nombre y abreviatura de los 20 aminoácidos proteicos en humanos.



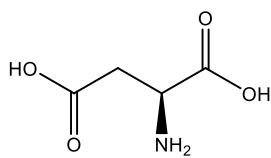
Alanina (ALA) (A)



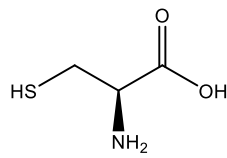
Arginina (ARG) (R)



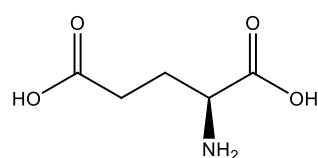
Asparagina (ASN) (N)



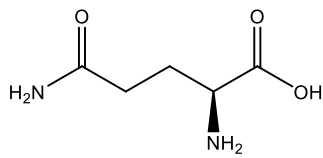
Ácido aspártico (ASP) (D)



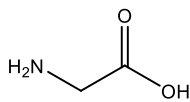
Cisteina (CYS) (C)



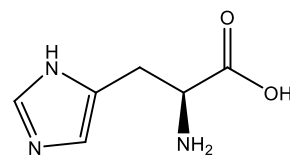
Ácido glutámico (GLU) (E)



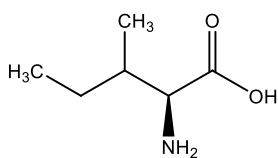
Glutamina (GLN) (Q)



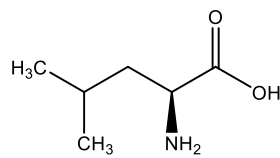
Glicina (GLY) (G)



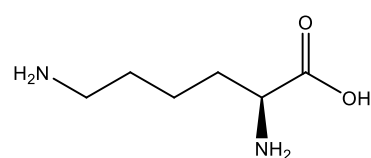
Histidina (HID) (H)



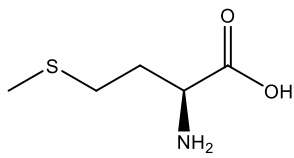
Isoleucina (ILE) (I)



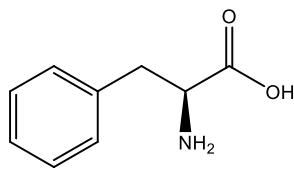
Leucina (LEU) (L)



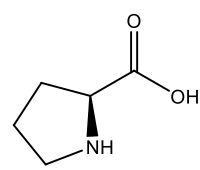
Lisina (LYS) (K)



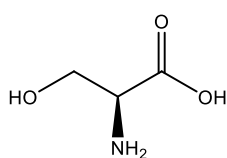
Metionina (MET) (M)



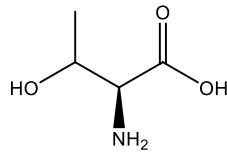
Fenilalanina (PHE) (F)



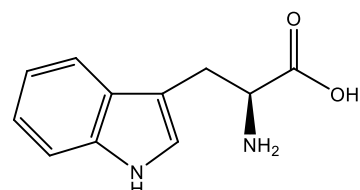
Prolina (PRO) (P)



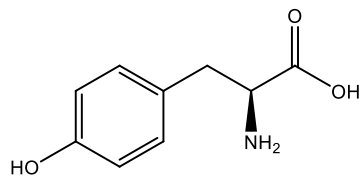
Serina (SER) (S)



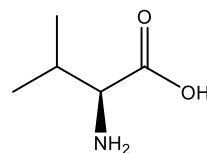
Treonina (THR) (T)



Triptófano (TRP) (W)



Tirosina (TYR) (Y)



Valina (VAL) (V)

9.2. Tablas Suplementarias.

Tabla S1. Listado de interacciones del ligando **13** en GalNAc-T2.

13				
Uridina	Pirofosfato			5-S-GalNAc
H-bonds	H-bonds	Salt-bridge	Metal	H-bonds
Arg01	Arg362	Arg362	Mn	Gly309
Asp176	Trp331			Asp224
Thr143				Asp224
His145				Arg208
Ser225				Glu334
Thr143				Gly332
				Glu334

Tabla S2. Listado de interacciones del ligando **L5** en GalNAc-T2.

L5				
<i>Uridina</i>	Difosfato			GalNAc
<i>H-bonds</i>	H-bonds	Salt-bridge	Metal	H-bonds
Arg201	Arg362	Arg362	Mn	Arg362
Asp176	Arg362		Mn	Arg362
Thr143	Trp331		Mn	
Ser225				
Arg362				

Tabla S3. Listado de interacciones del ligando **1** en GalNAc-T2.

1			
Uridina	Difosfato		
H-bonds	H-bonds	Salt-Bridge	Metal
Arg201	Arg362	Arg362	Mn
Asp176	Arg362		Mn
Thr143			Mn
Thr143			
Ser225			

Tabla S4. Listado de interacciones del ligando **2** en GalNAc-T2.

2			
Uridina	Difosfato		Pirrolidina
H-bonds	H-bonds	Metal	H-bonds
Arg201	Arg362	Mn	Arg362
Asp176	Arg362		Arg362
Thr143			
Arg362			
Thr143			

Tabla S5. Listado de interacciones del ligando **3** en GalNAc-T2.

3			
Uridina	Difosfato		Pirrolidina
H-bonds	H-bonds	Metal	pi-stacking
Arg201	Arg362	Mn	Phe377
Asp176	Arg362		
Thr143			
Thr143			
Ser225			

Tabla S6. Listado de interacciones del ligando **4** en GalNAc-T2.

4					
Uridina	Difosfato			Pirrolidina	
H-bonds	H-bonds	Metal	Salt-bridge	H-bonds	Salt-bridge
Arg201	Arg362	Mn	Arg362	Arg208	Asp224
Asp176				Glu334	
Thr143				Ala307	
Thr143					
Ser225					

Tabla S7. Listado de interacciones del ligando **5** en GalNAc-T2.

5			
Uridina	Difosfato		Pirrolidina
H-bonds	H-bonds	Metal	H-bonds
Arg201	Arg362	Mn	Arg362
Asp176	Arg362		
Thr143			
Ser225			

Tabla S8. Listado de interacciones del ligando **6** en GalNAc-T2.

6				
Uridina	Difosfato			Pirrolidina
H-bonds	H-bonds	Metal	Salt-bridge	H-bonds
Arg201	Arg362	Mn1570	Arg362	Arg362
Asp176	Trp331			Arg362
Thr143				
Thr143				
Ser225				

Tabla S9. Listado de interacciones del ligando **7** en GalNAc-T2.

7				
Uridina	Puente			Pirrolidina
H-bonds	H-bonds	Salt-bridge	Metal	π-π
Arg201	Arg362	Arg362	Mn	Phe361
Asp176				His359
Thr143				Phe377
Thr143				
Arg362				

Tabla S10. Listado de interacciones del ligando **8** en GalNAc-T2.

8				
Uridina	Puente		Pirrolidina	
H-bonds	H-bonds	Metal	H-bonds	Salt-bridge
Arg201	Arg362	Mn	Ala307	Glu334
Asp176			Arg208	
Thr143			Glu334	
Ser225				
Thr143				

Tabla S11. Listado de interacciones del ligando **9** en GalNAc-T2.

9			
Uridina	Puente		pirrolidina
H-bonds	H-bonds	Metal	pi-stacking
Arg201	Arg362	Mn	Phe361
Asp176			His359
Thr143			Phe377
Ser225			
Thr143			
Arg362			

Tabla S12. Listado de interacciones del ligando **10** en GalNAc-T2.

10				
Uridina	Puente		Pirrolidina	
H-bonds	H-bonds	Metal	H-bonds	Salt-bridge
Arg201	Arg362	Mn	Arg208	Glu334
Asp176			Glu334	
Thr143				
Ser225				
Thr143				

Tabla S13. Listado de interacciones del ligando **11** en GalNAc-T2.

11			
Uridina	Puente		Pirrolidina
H-bonds	H-bonds	Metal	Salt-bridge
Arg201	Arg362	Mn	Asp224
Asp176			Glu334
Thr143			
Ser225			
Thr143			

Tabla S14. Listado de interacciones del ligando **12** en GalNAc-T2.

12				
Uridina	Puente		Pirrolidina	
H-bonds	H-bonds	Metal	H-bonds	Salt-bridge
Arg201	Arg362	Mn	Arg208	Glu334
Asp176			Glu334	
Thr143			Ala307	
Ser225				
Thr143				

Tabla S15. Listado de interacciones del ligando **14** en GalNAc-T3.

14			
Uridina	Pirofosfato		
H-bonds	H-bonds	Salt-Bridge	Metal
Arg252	His421	Arg416	Mn
His192	His413		
Ala276	Trp385		

Tabla S16. Listado de interacciones del ligando **1** en GalNAc-T3.

1			
Uridina		Pirofosfato	
H-bonds	Metal	H-bonds	Salt-Bridge
Arg252	Mn	Arg416	Arg416
Arg416			

Tabla S17. Listado de interacciones del ligando **2** en GalNAc-T3.

2			
Uridina	Pirofosfato		Pirrolidina
H-bonds	H-bonds	Salt-Bridge	H-bonds
Arg252	His421	Arg416	Arg259
Asp223	Trp385		Ala361
His192			Glu388
Ala276			
Val190			

Tabla S18. Listado de interacciones del ligando **4** en GalNAc-T3.

4		
Uridina	Pirofosfato	Pirrolidina
H-bonds	H-bonds	H-bonds
Arg252	Trp385	Arg416
Asp223	Arg416	

Tabla S19. Listado de interacciones del ligando **7** en GalNAc-T3.

7			
Uridina		Puente	Pirrolidina
H-bonds	Catión-π	H-bonds	
His192	Arg416	Arg416	
Arg416			
Asp275			

Tabla S20. Listado de interacciones del ligando **8** en GalNAc-T3.

8			
Uridina	Puente		Pirrolidina
H-bonds	H-bonds	Salt-bridge	H-bonds
Arg252	Arg416	Arg416	Asp275
Asp223			Ala361
Val190			

Tabla S21. Listado de interacciones del ligando **9** en GalNAc-T3.

9				
Uridina	Puente		pirrolidina	
H-bonds	H-bonds	Salt-bridge	H-bonds	π-π
Arg252	Arg416	Arg416	Asp275	Trp337
Asp223				
Val190				

Tabla S22. Listado de interacciones del ligando **11** en GalNAc-T3.

11		
Uridina	Puente	Pirrolidina
H-bonds	H-bonds	π-π
Arg252	Trp385	Trp389
Asp223		

Tabla S23. Listado de interacciones del ligando **12** en GalNAc-T3.

12				
Uridina		Puente		Pirrolidina
H-bonds	π-stacking	H-bonds	Salt-bridge	H-bonds
Arg252	His421	Arg416	Arg416	Asp275
Val190				Ala361
Ala276				

9.3. Figuras suplementarias.

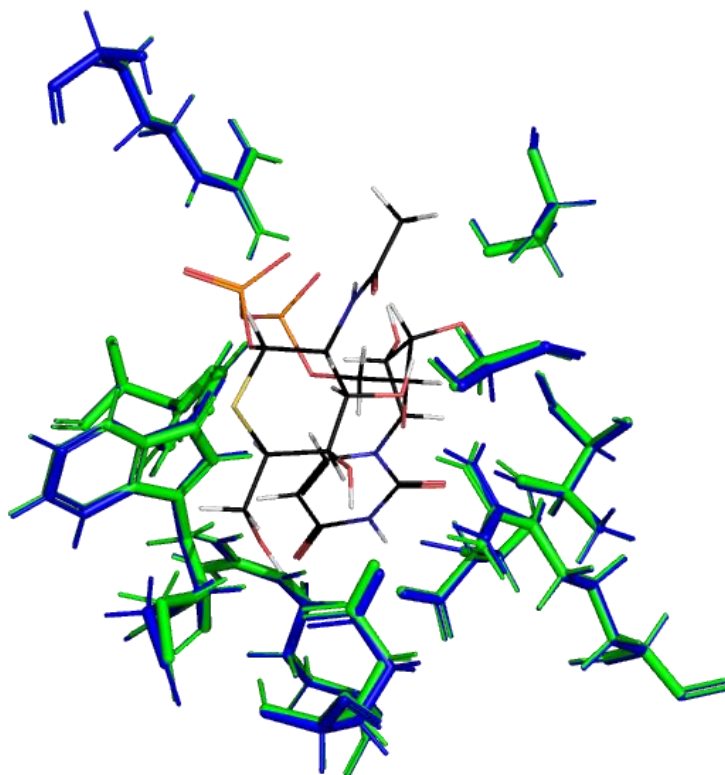


Figura S1: Comparativa entre minimización del enzima con ligando (azul) y sin ligando (amarillo).

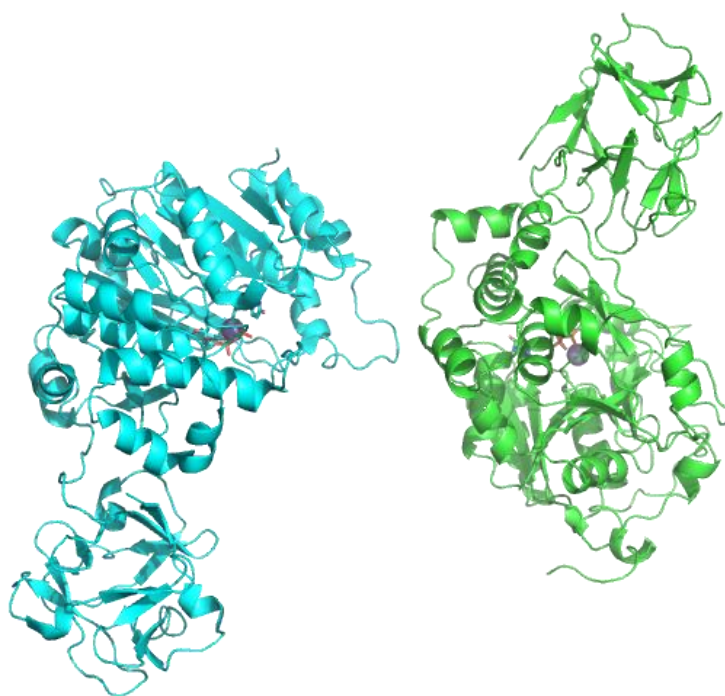


Figura S2: Comparativa estructural GalNAc-T2 (cian) y GalNAc-T3 (amarillo). Estructuras similares con el dominio C-terminal tipo lectina. (abajo en la T2 y arriba en la T3) y el N-terminal catalítico (arriba en la T2 y abajo en la T3)

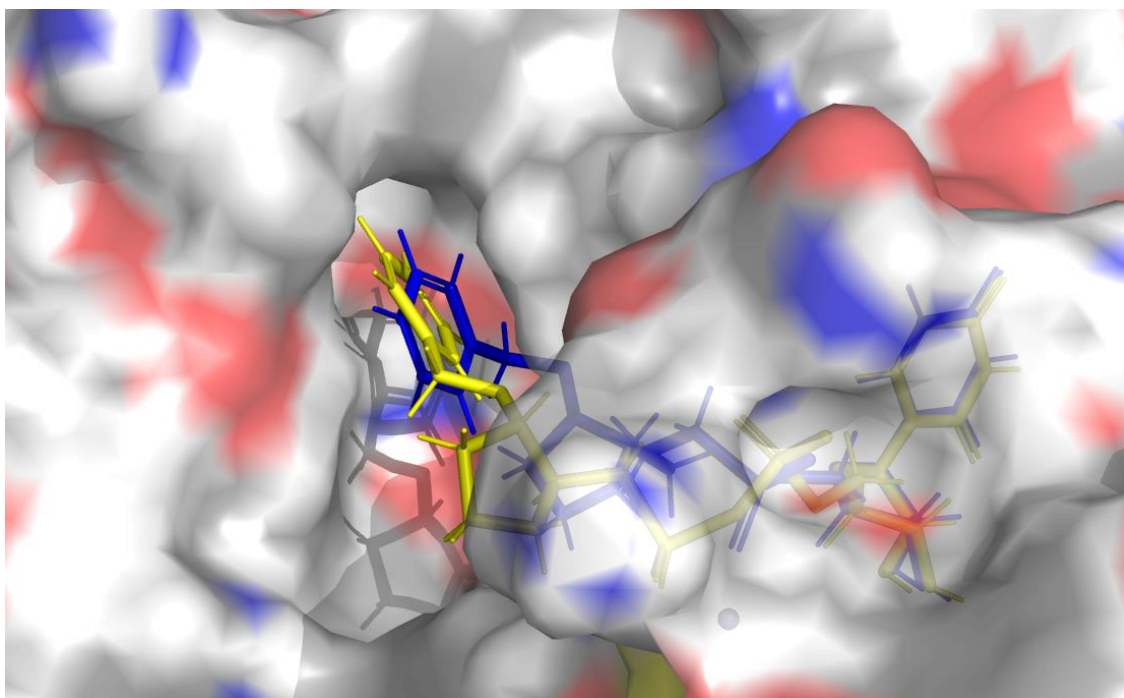


Figura S3: bolsillo hidrofóbico GalNAc-T2. Los grupos bencilos de los ligandos **5** (amarillo) y **11** (azul) se disponen en el interior del dicho bolsillo.

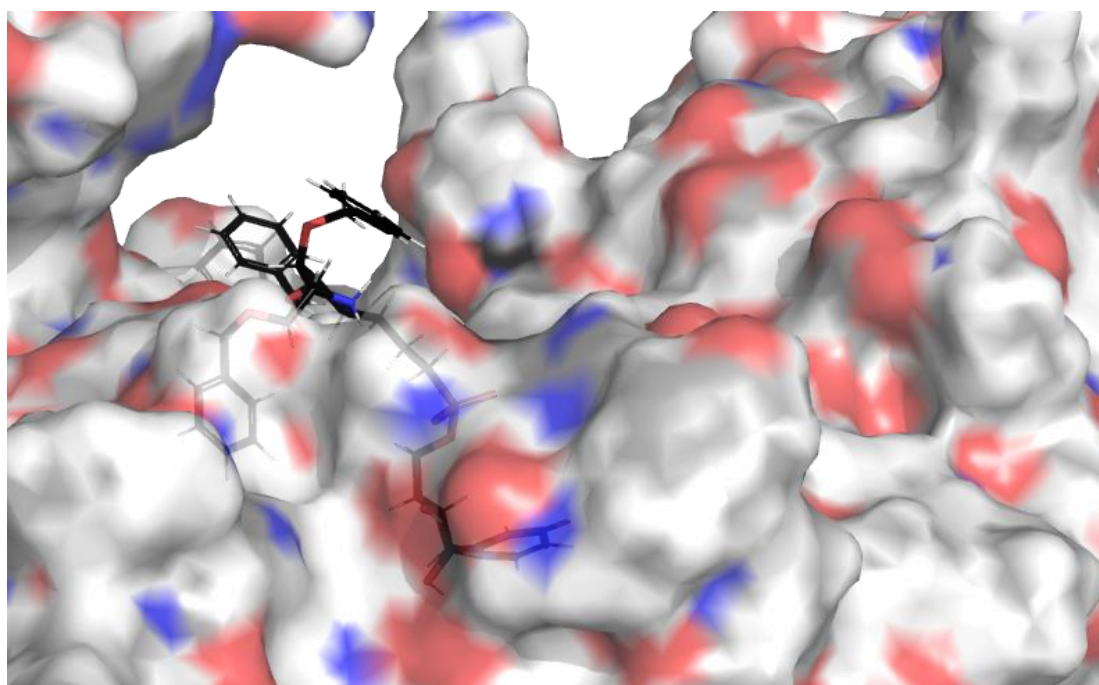


Figura S4: Grupos bencilo del ligando **7** orientados fuera del sitio activo.

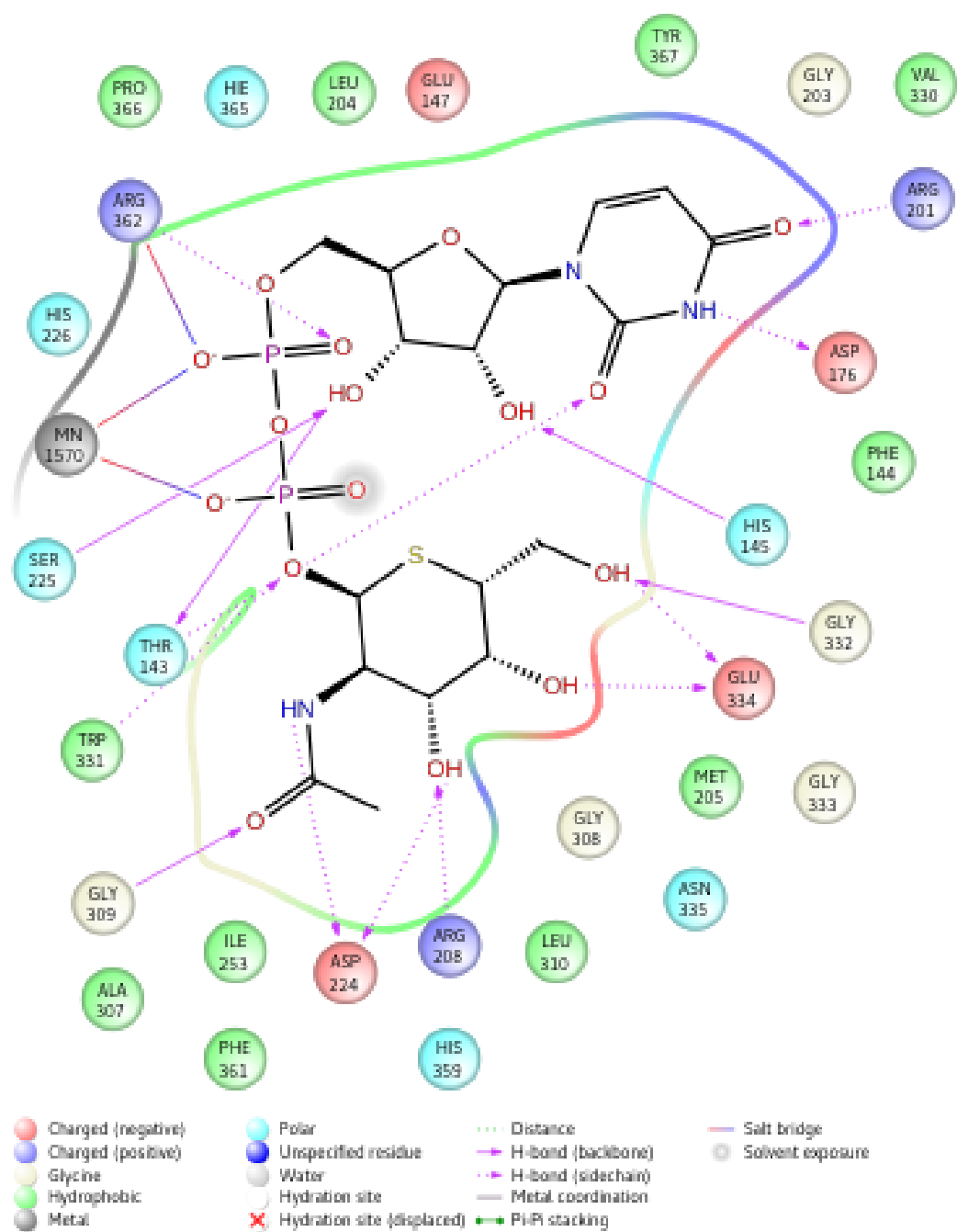


Figura S5: Interacciones 2D entre el ligando **13** y GalNAc-T2

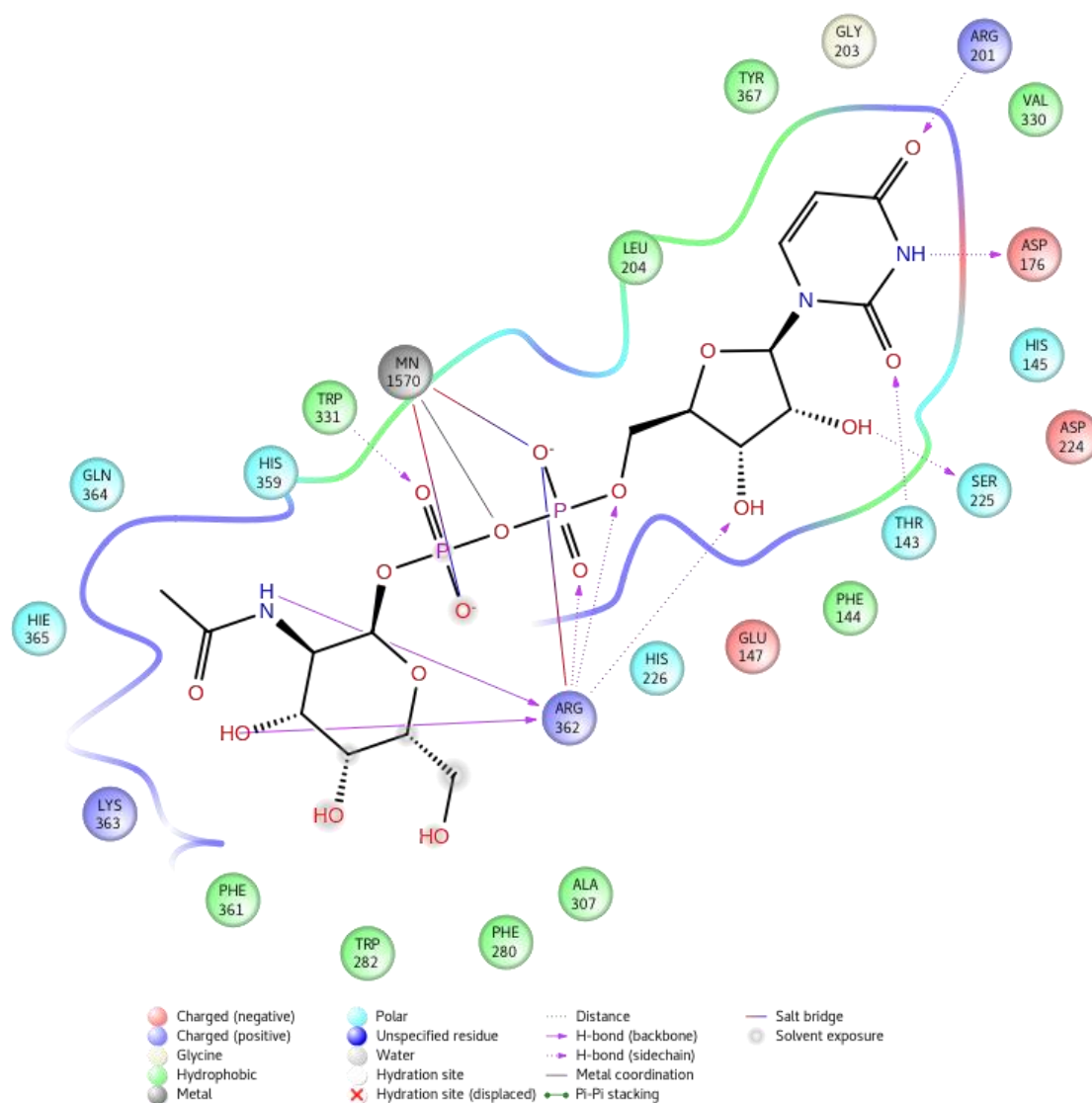


Figura S6: Interacciones 2D entre el ligando **L5** y GalNAc-T2

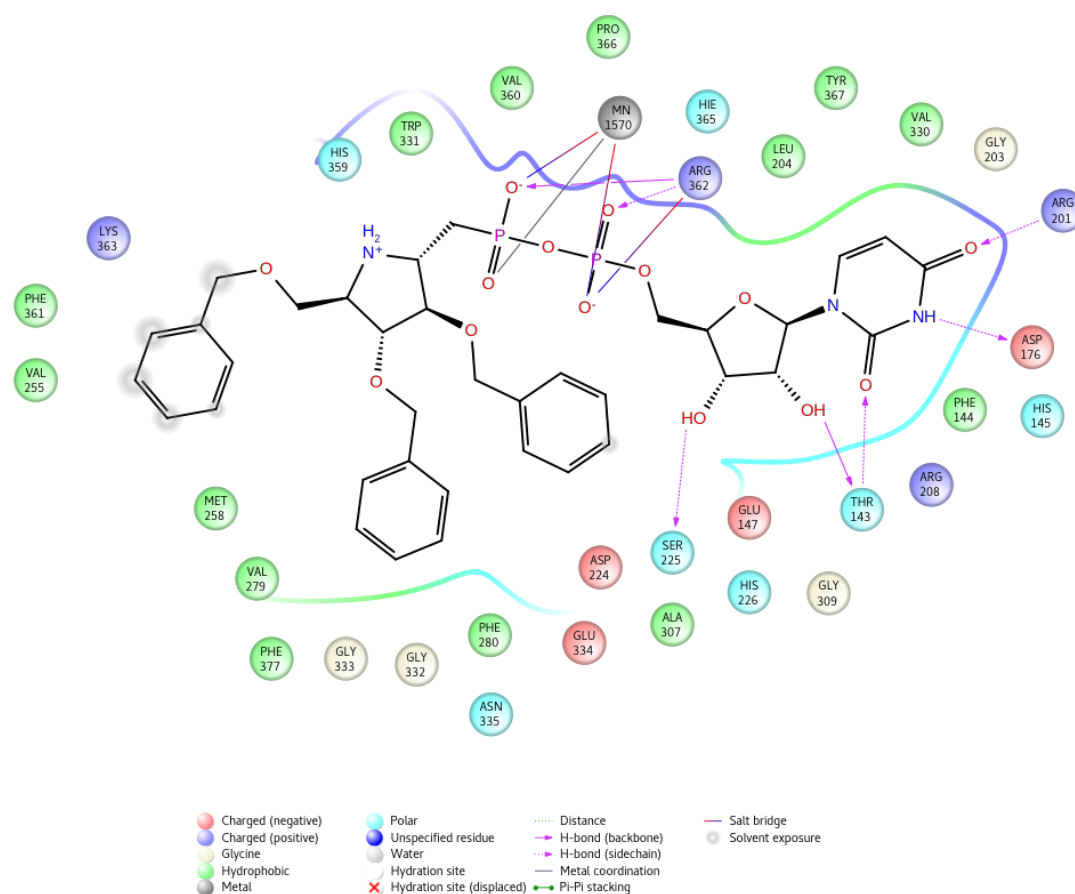


Figura S7: Interacciones 2D entre el ligando **1** y GalNAc-T2

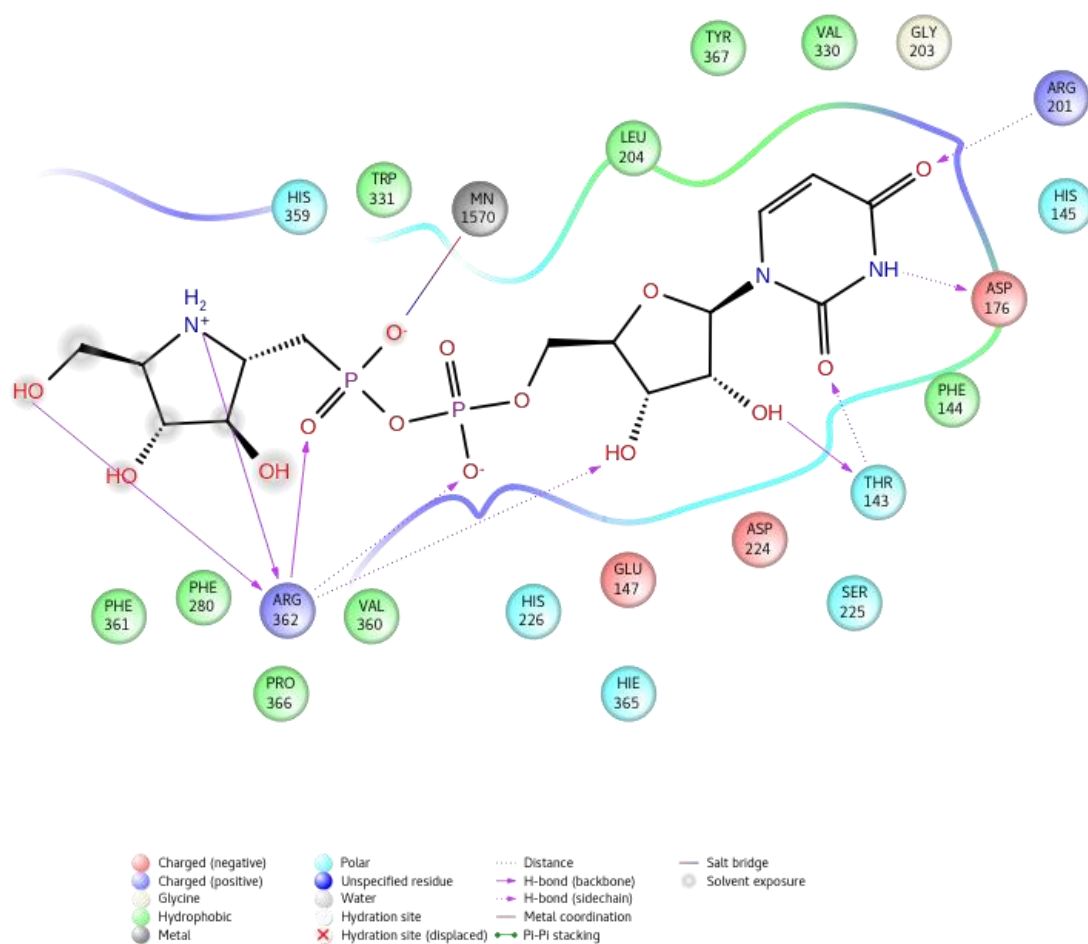


Figura S8: Interacciones 2D entre el ligando **2** y GalNAc-T2

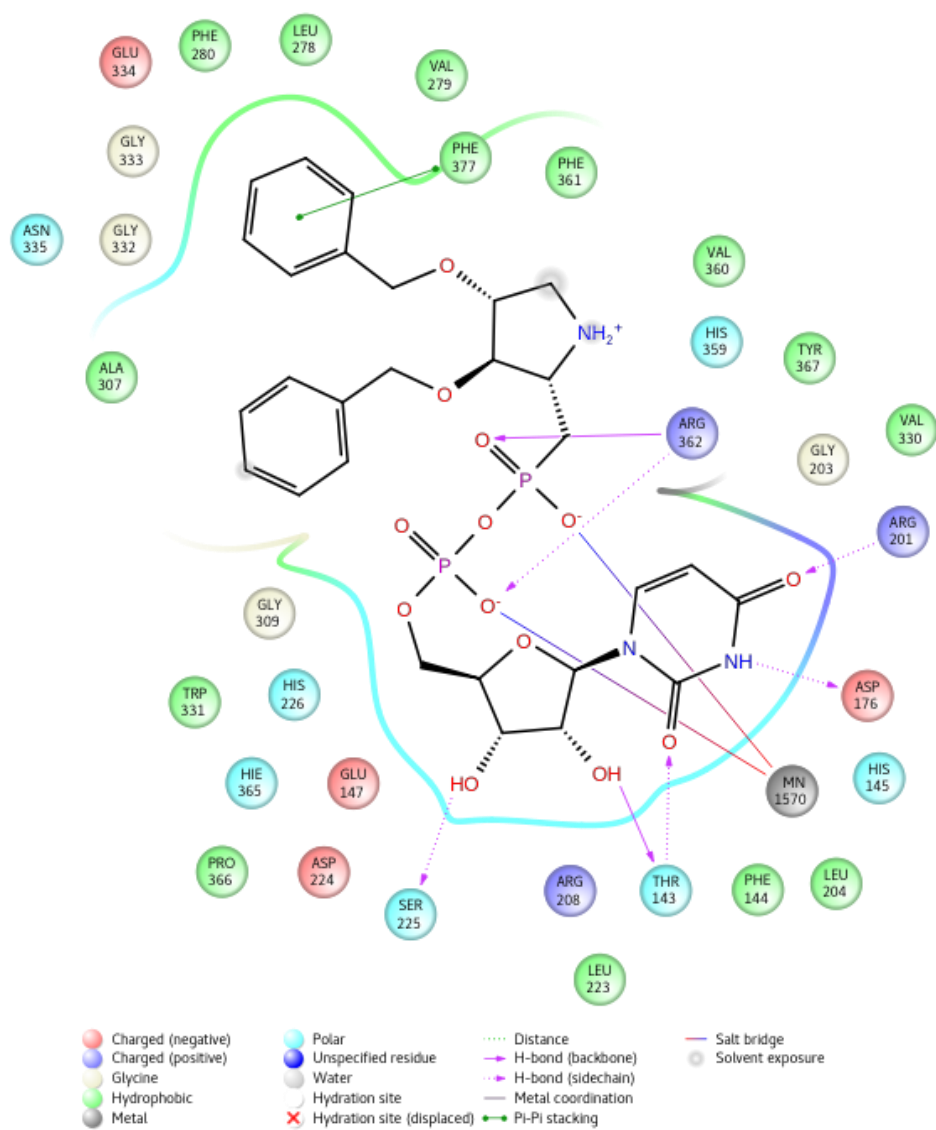


Figura S9: Interacciones 2D entre el ligando **3** y GalNAc-T2

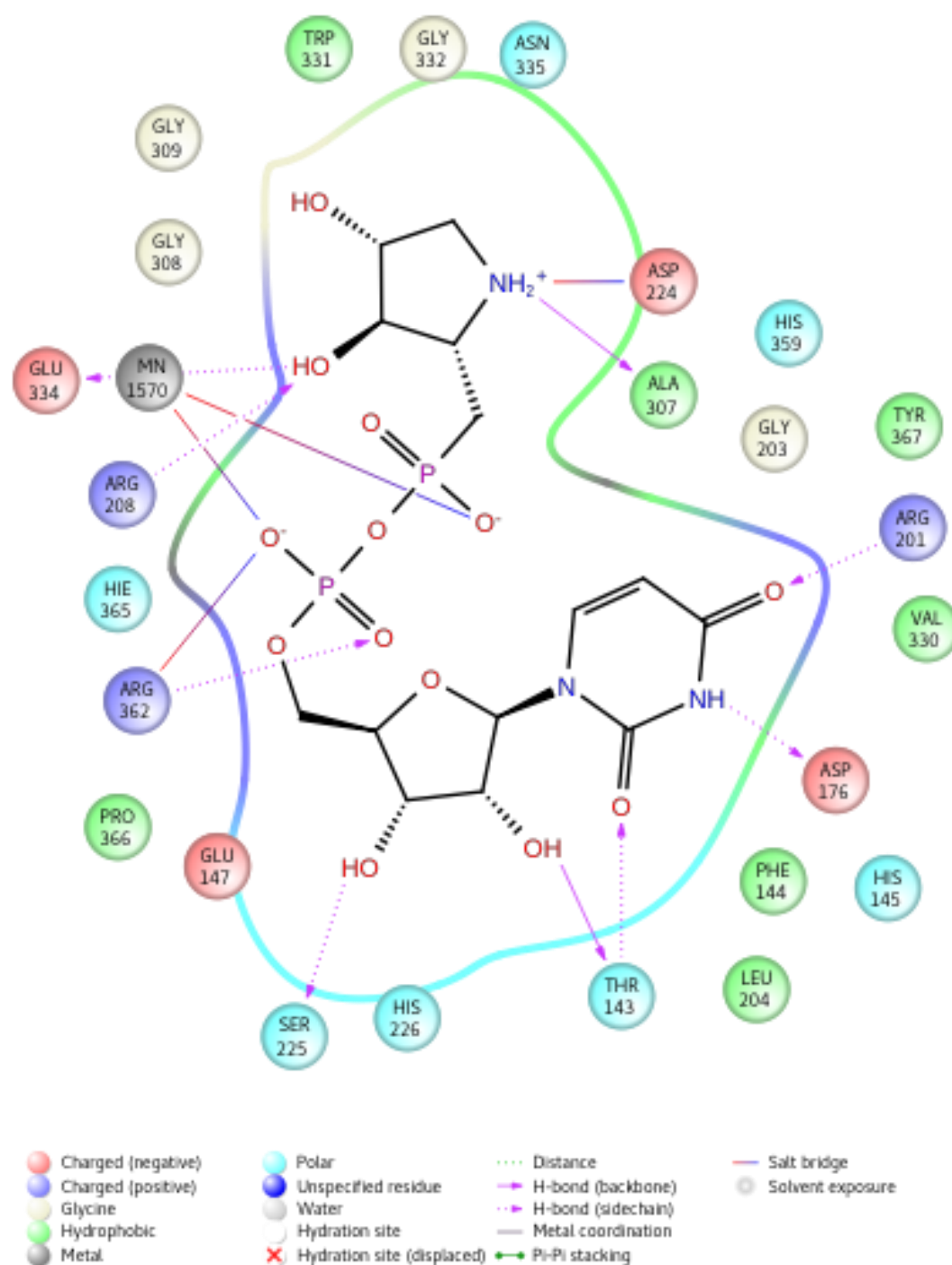


Figura S10: Interacciones 2D entre el ligando **4** y GalNAc-T2

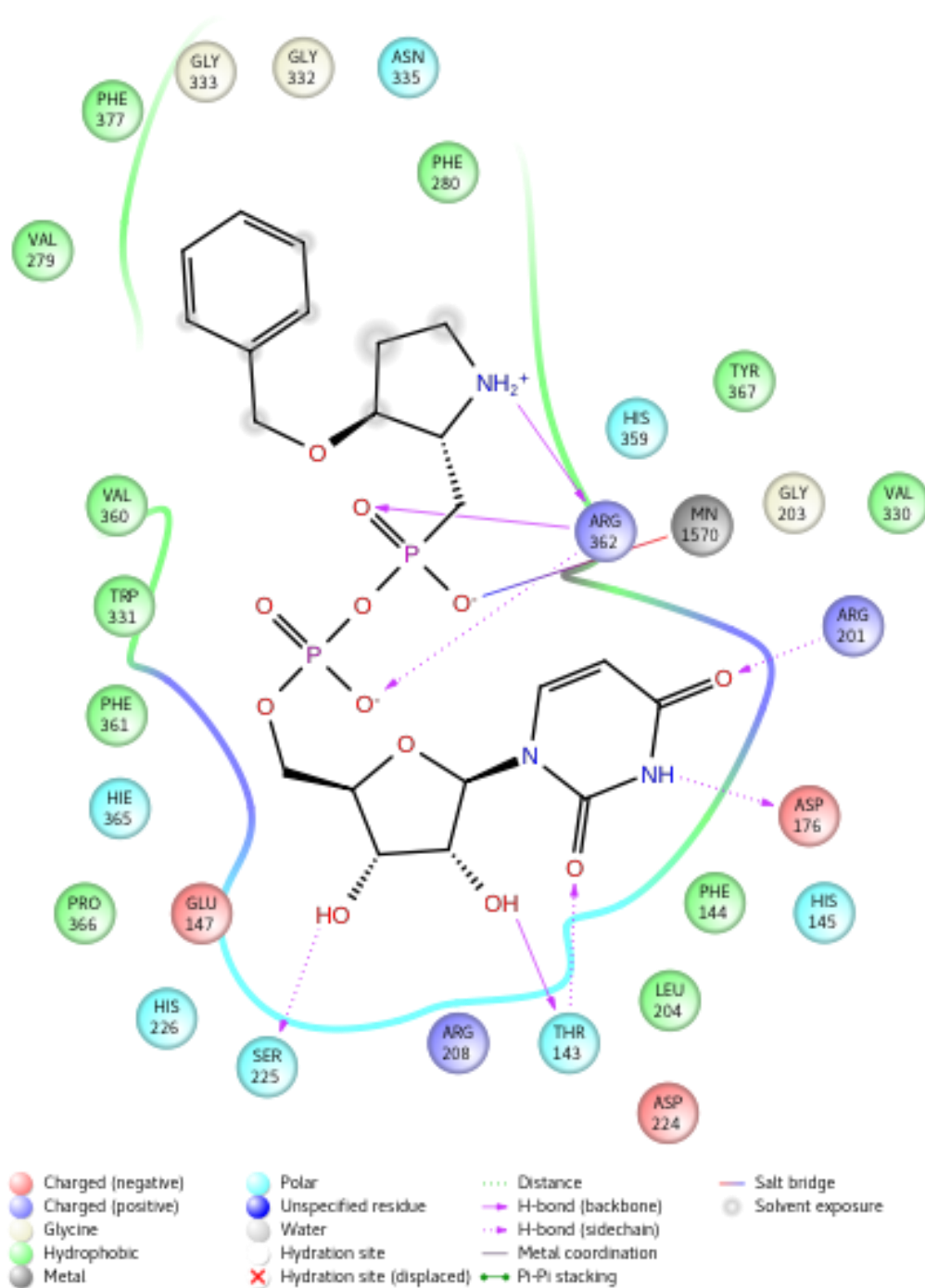


Figura S11: Interacciones 2D entre el ligando **5** y GalNAc-T2

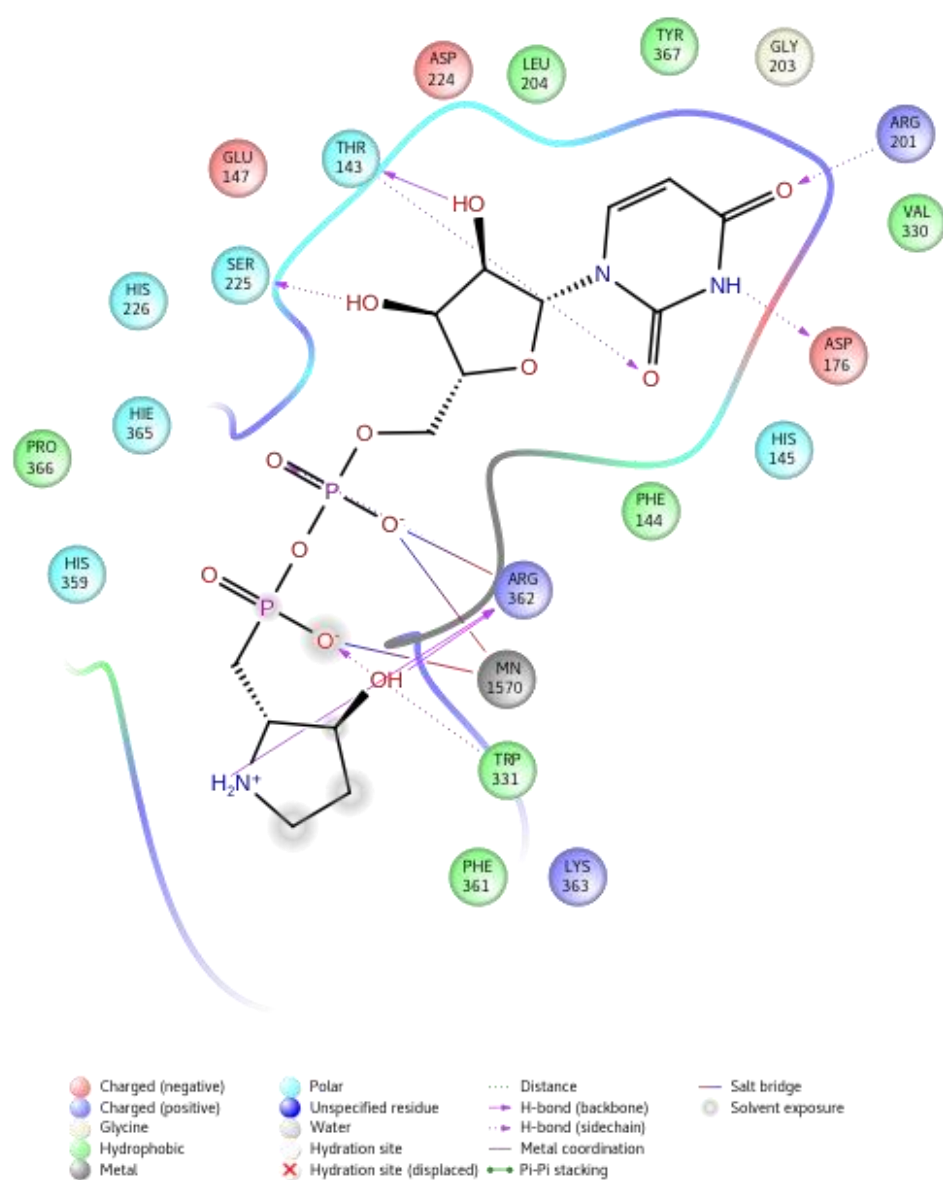


Figura S12: Interacciones 2D entre el ligando **6** y GalNAc-T2

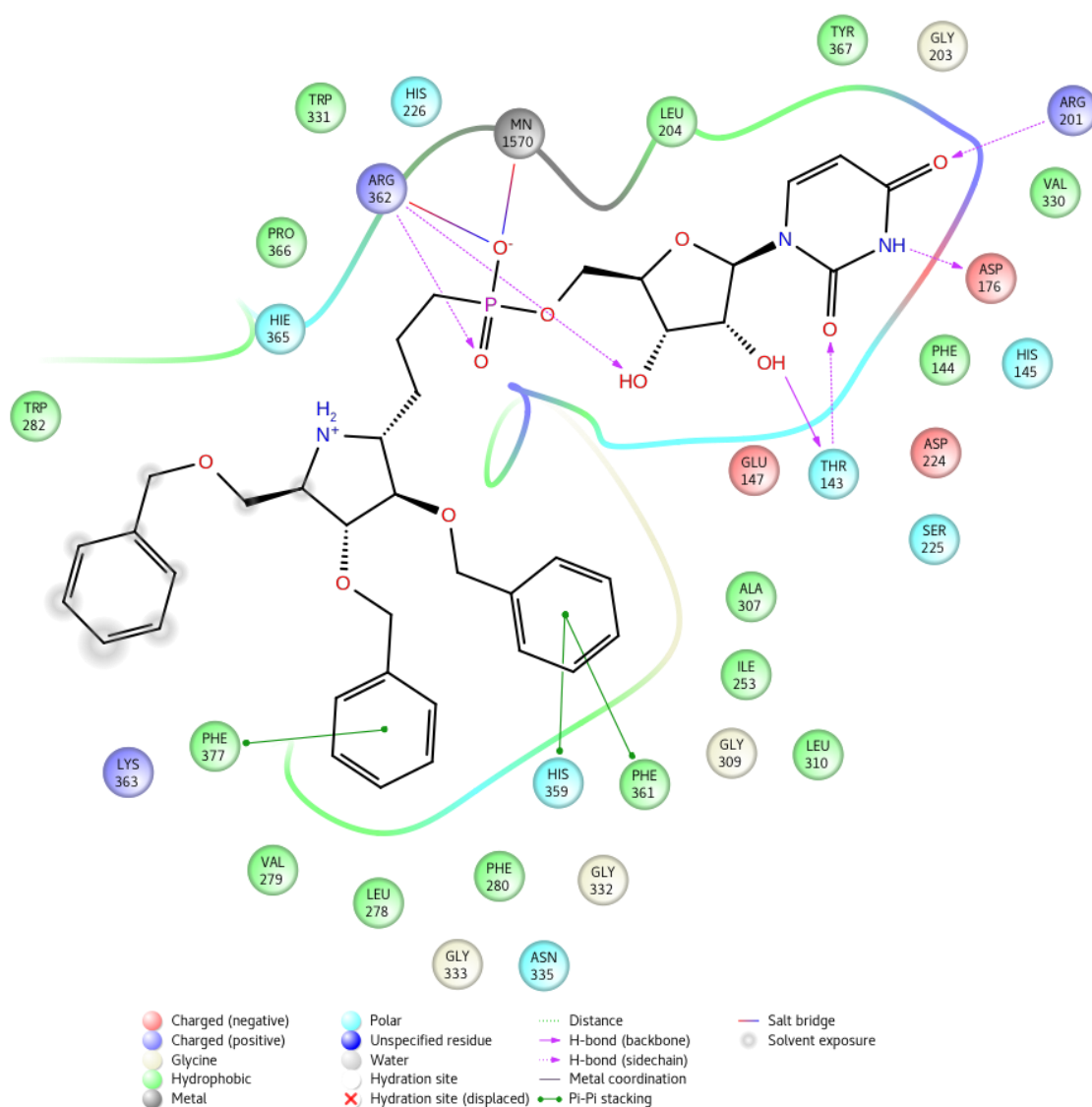


Figura S13: Interacciones 2D entre el ligando **7** y GalNAc-T2

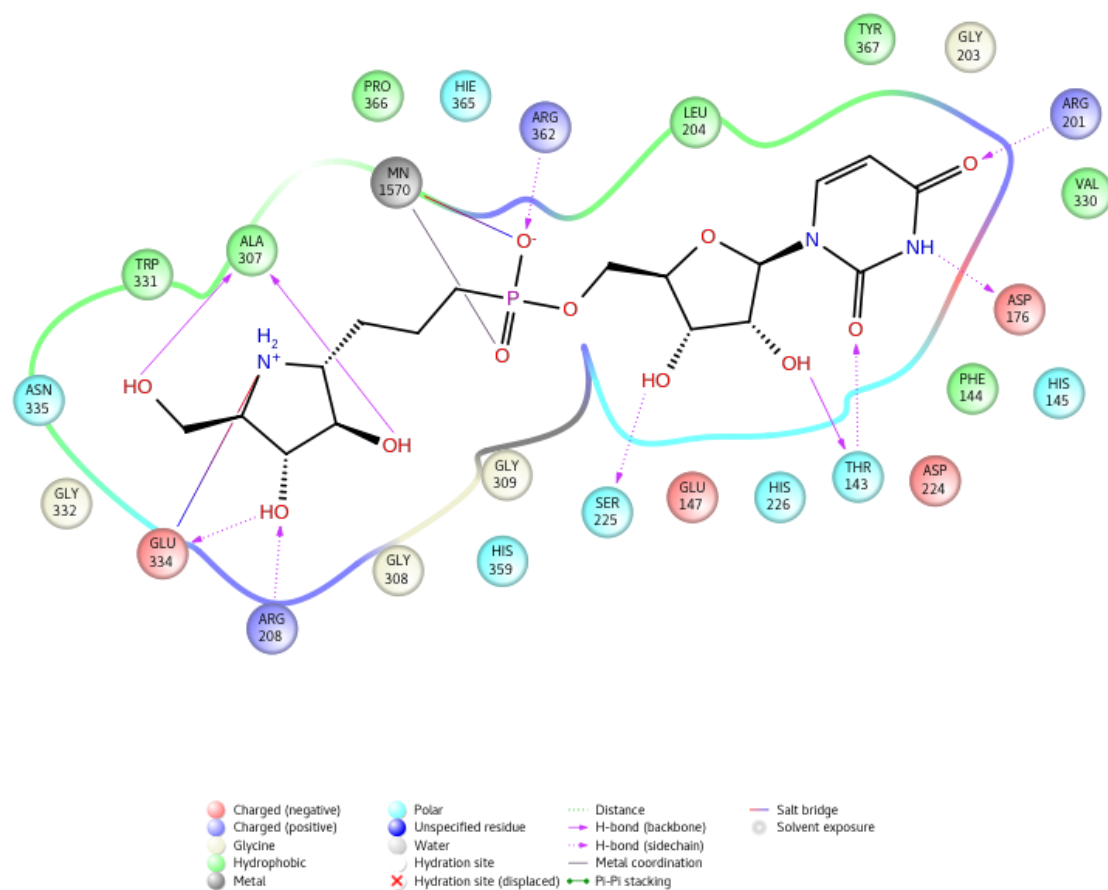


Figura S14: Interacciones 2D entre el ligando **8** y GalNAc-T2

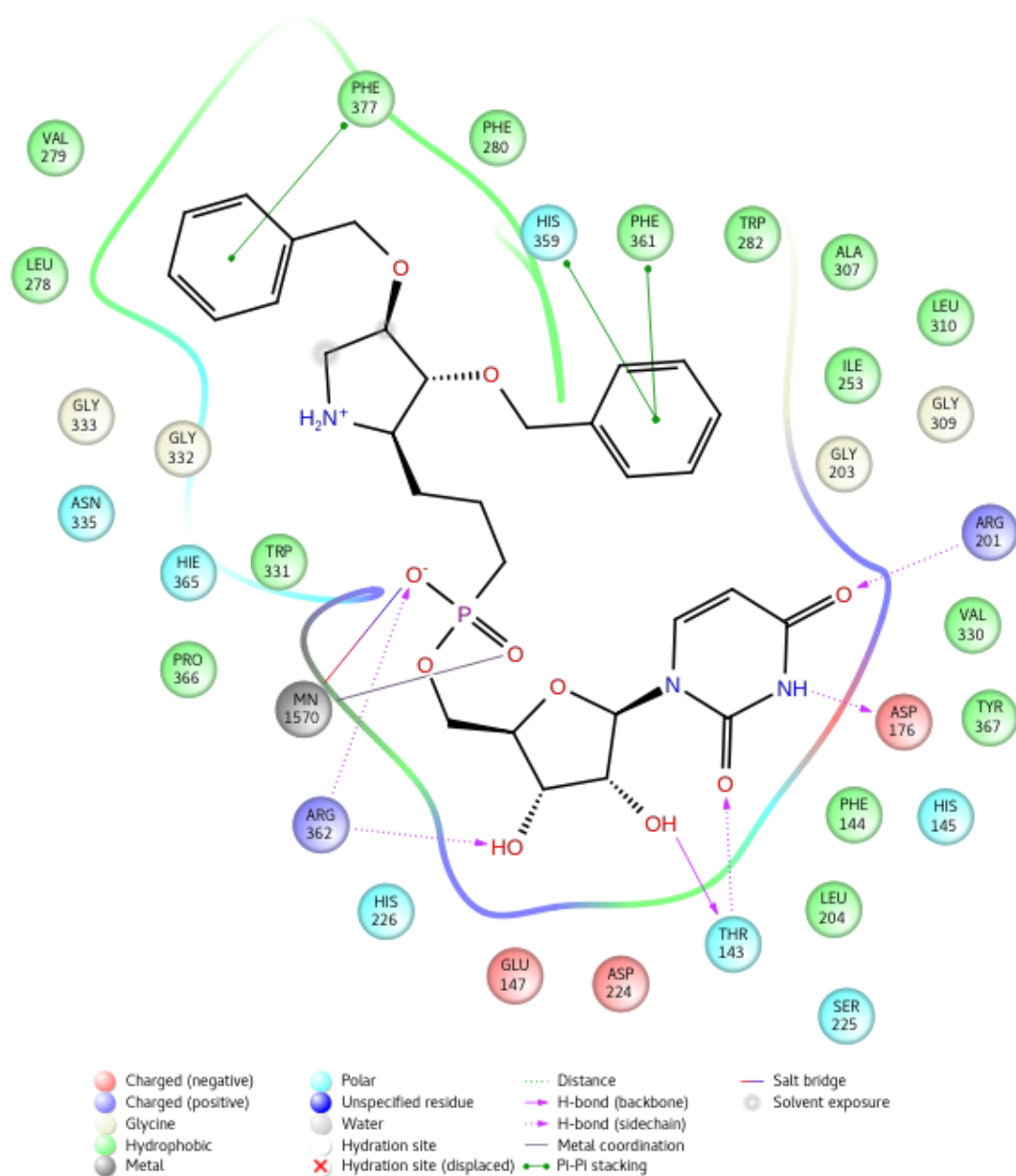


Figura S15: Interacciones 2D entre el ligando **9** y GalNAc-T2

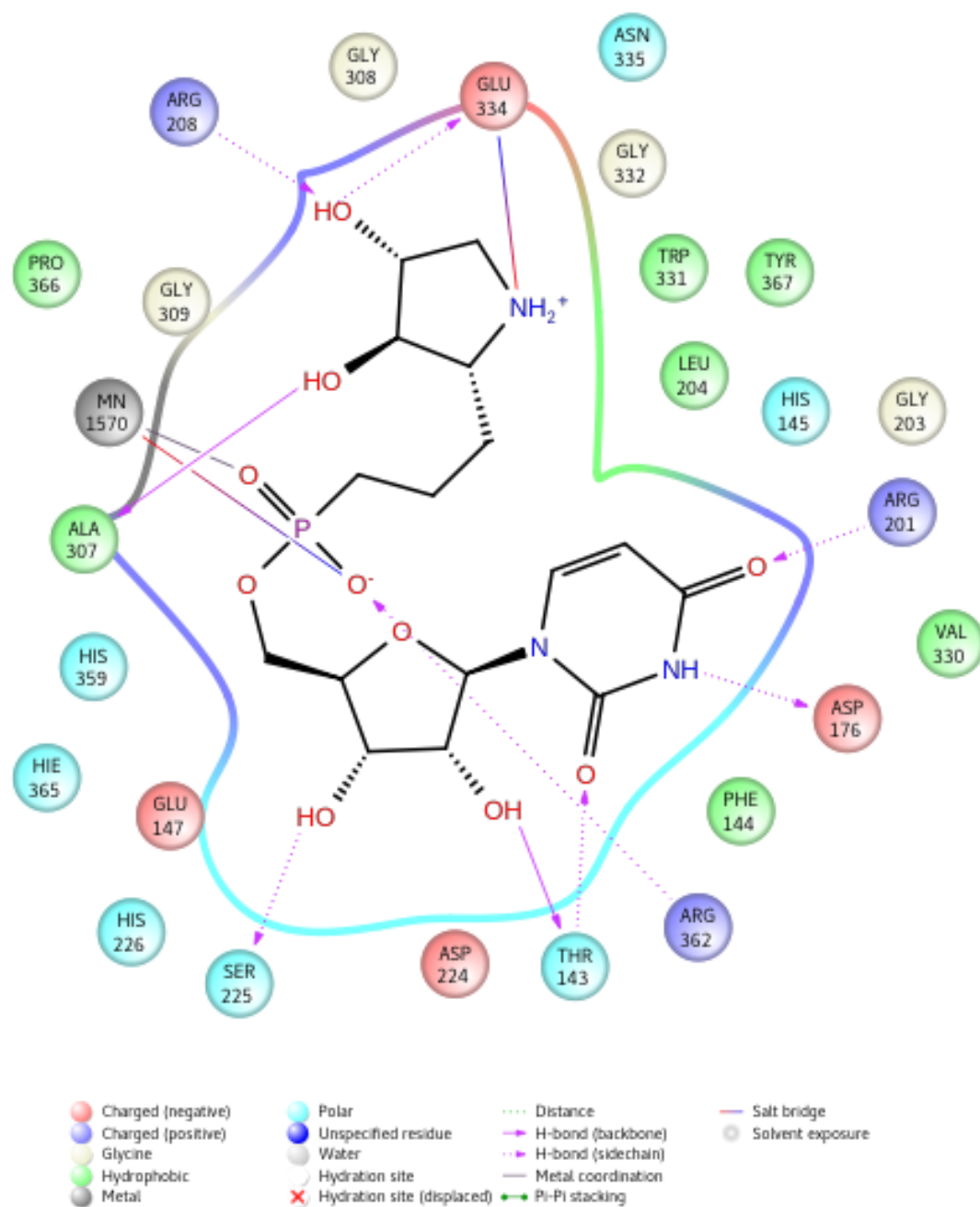


Figura S16: Interacciones 2D entre el ligando **10** y GalNAc-T2

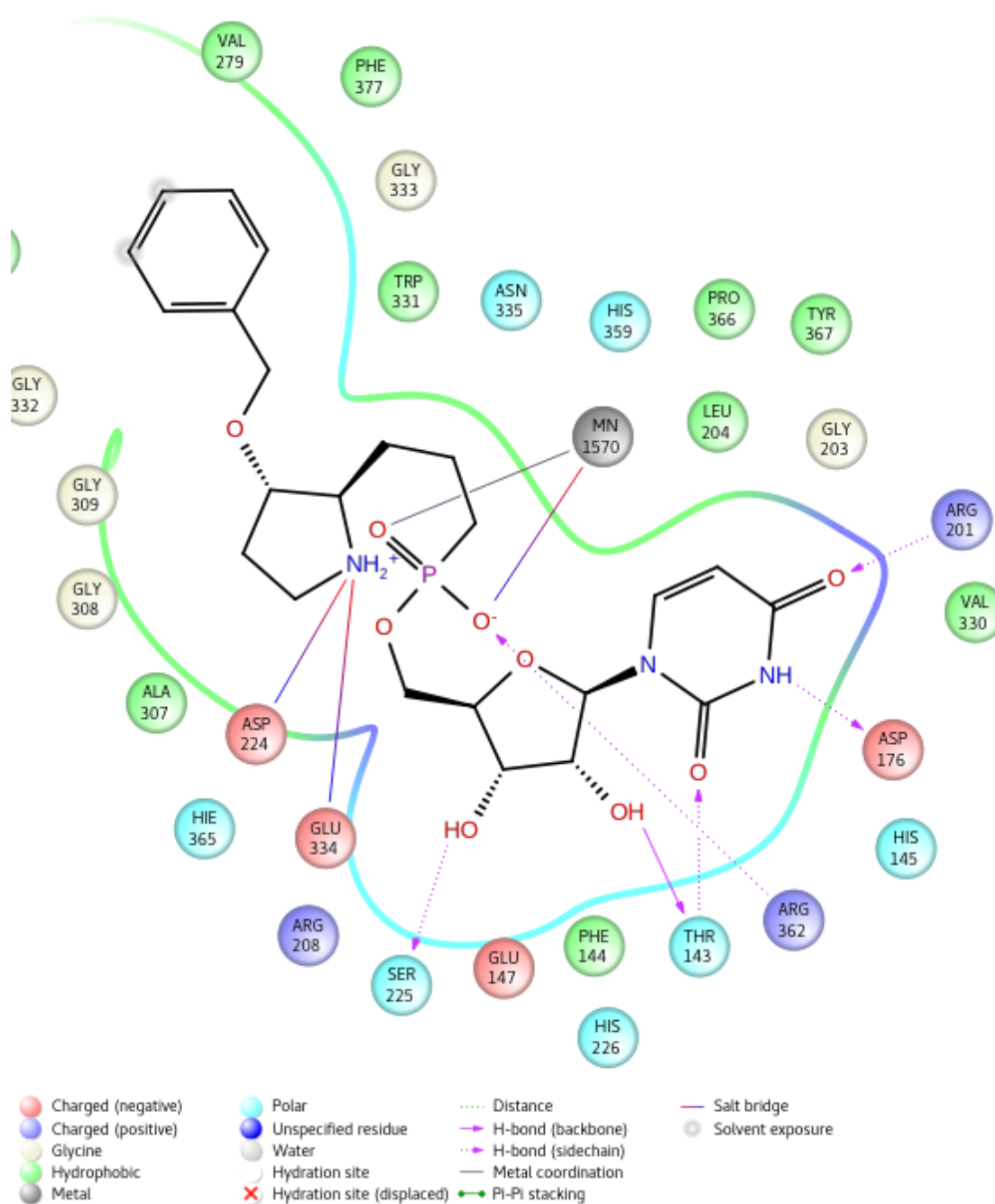


Figura S17: Interacciones 2D entre el ligando **11** y GalNAc-T2

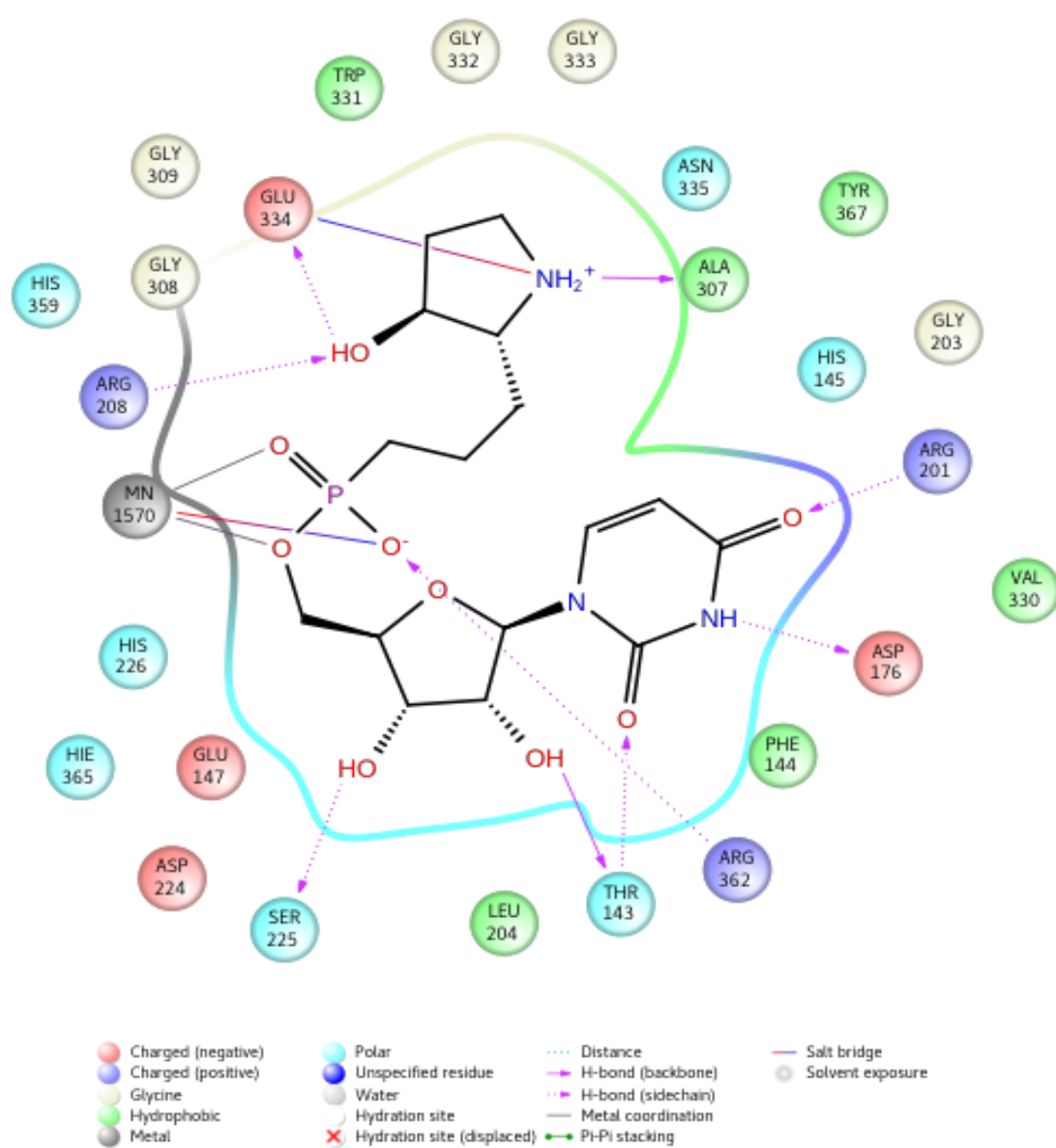


Figura S18: Interacciones 2D entre el ligando **12** y GalNAc-T2

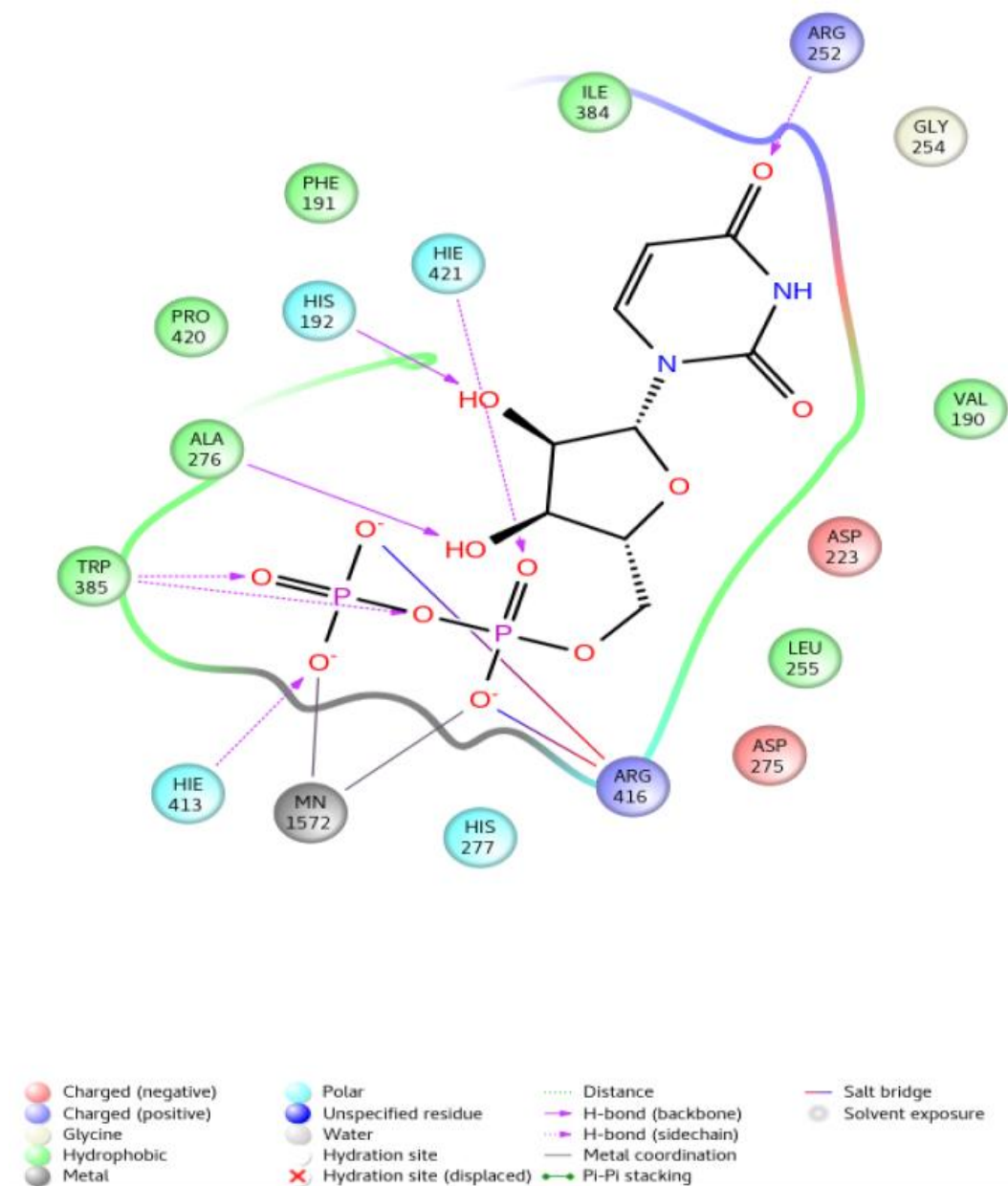


Figura S19: Interacciones 2D entre el ligando **14** y GalNAc-T3

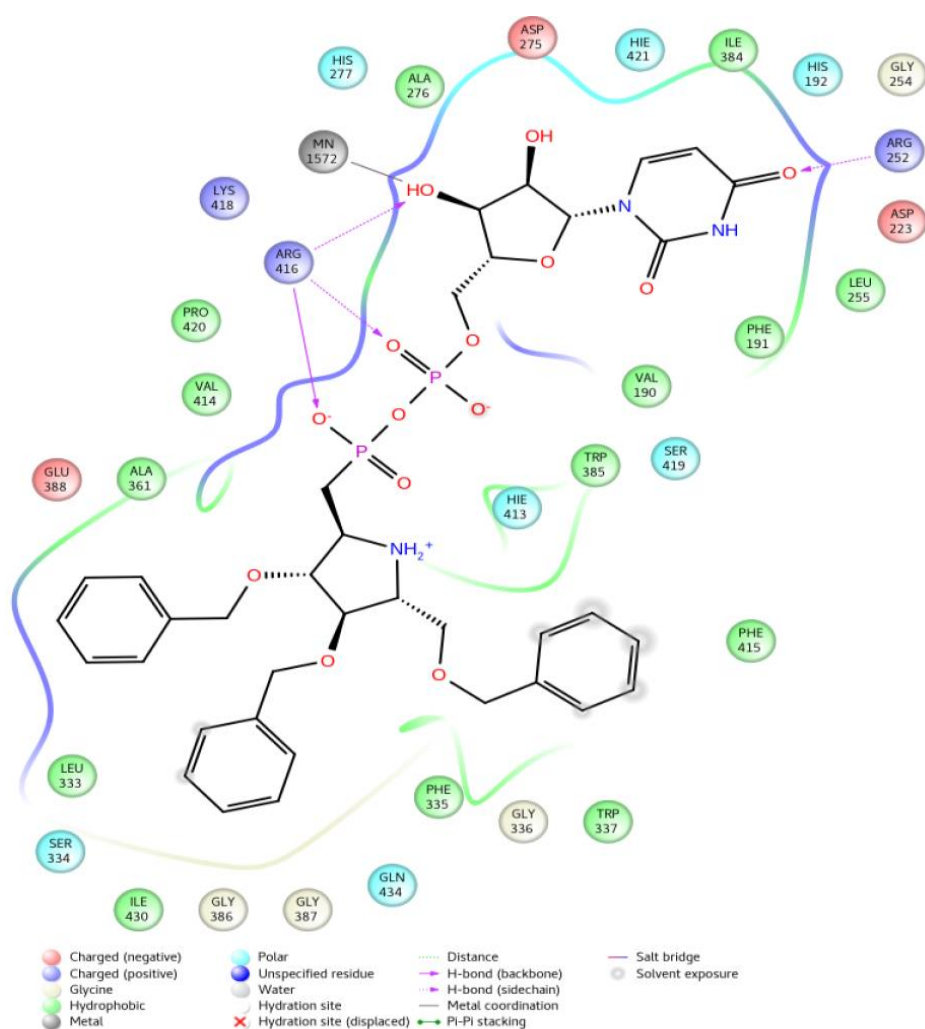


Figura S20: Interacciones 2D entre el ligando **1** y GalNAc-T3

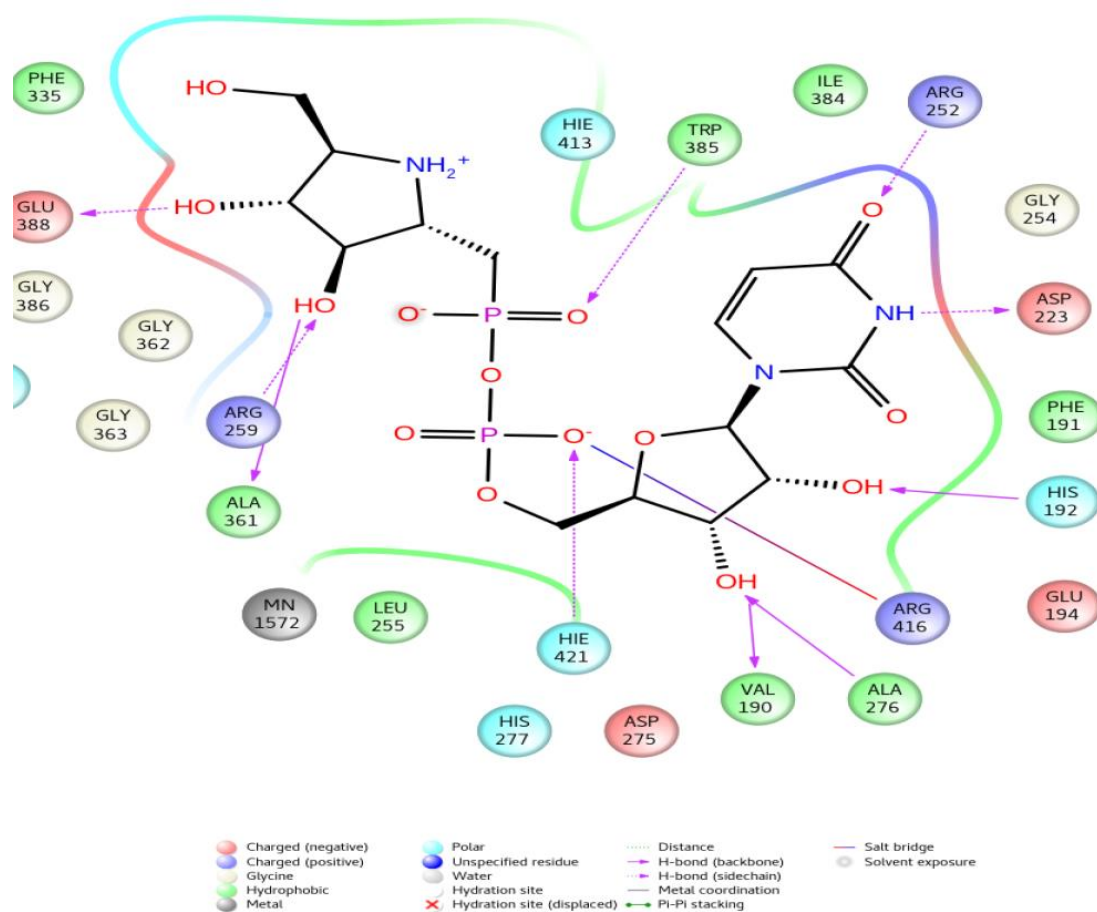


Figura S21: Interacciones 2D entre el ligando 2 y GalNAc-T3

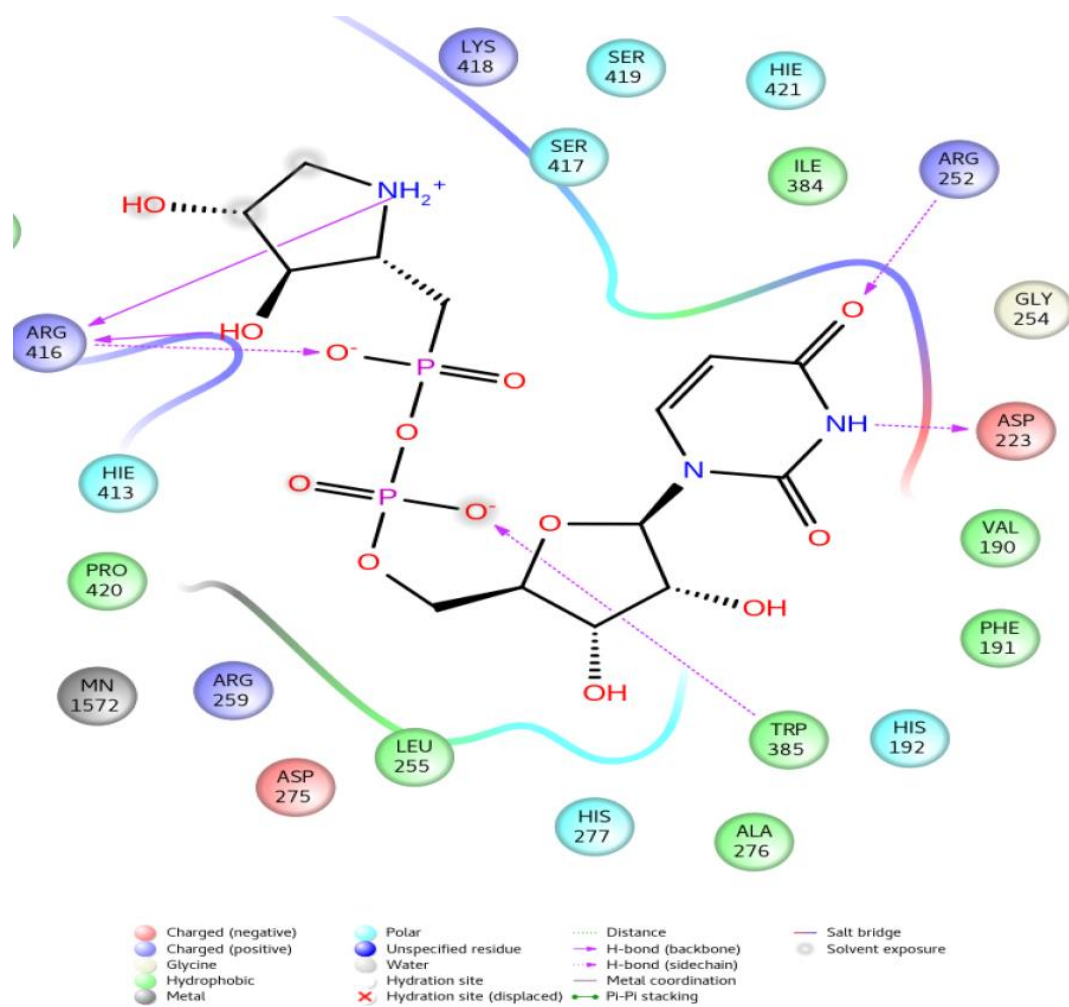


Figura S22: Interacciones 2D entre el ligando **4** y GalNAc-T3

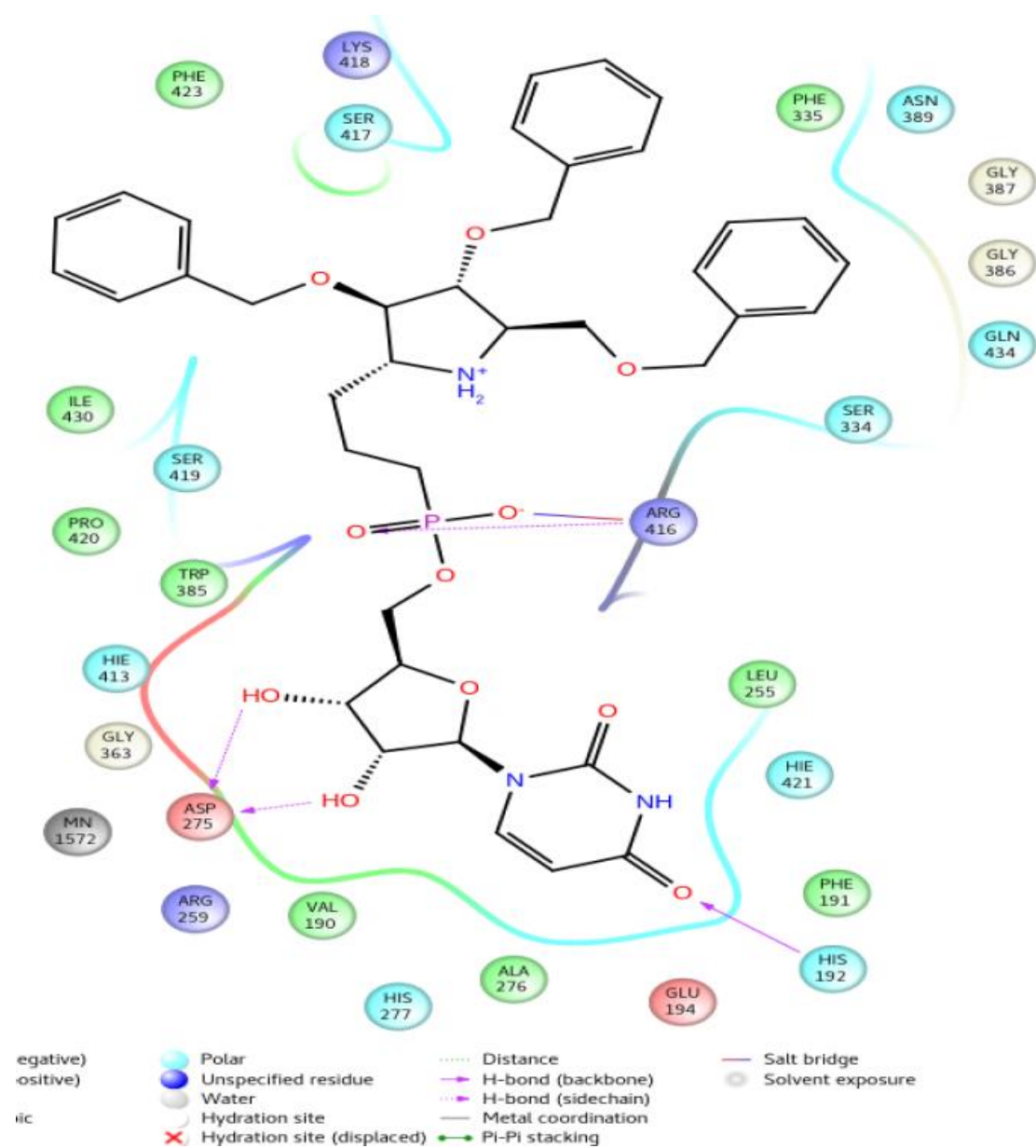


Figura S23: Interacciones 2D entre el ligando 7 y GalNAc-T3

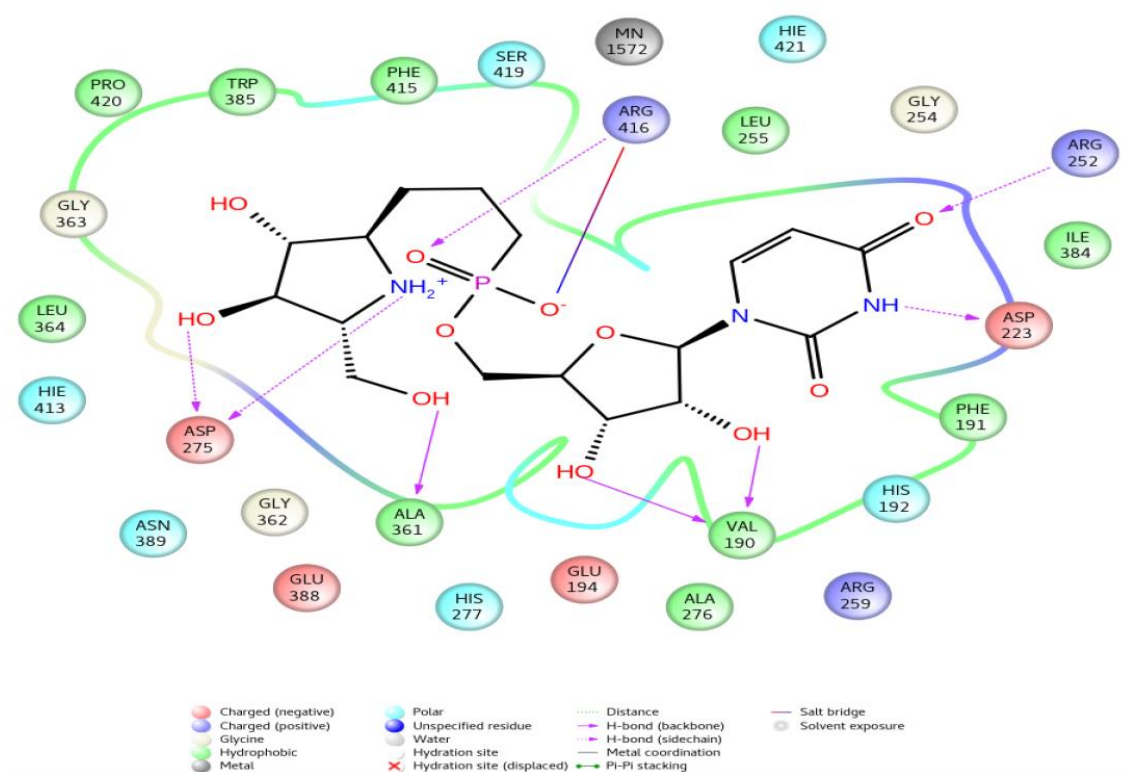


Figura S24: Interacciones 2D entre el ligando **8** y GalNAc-T3

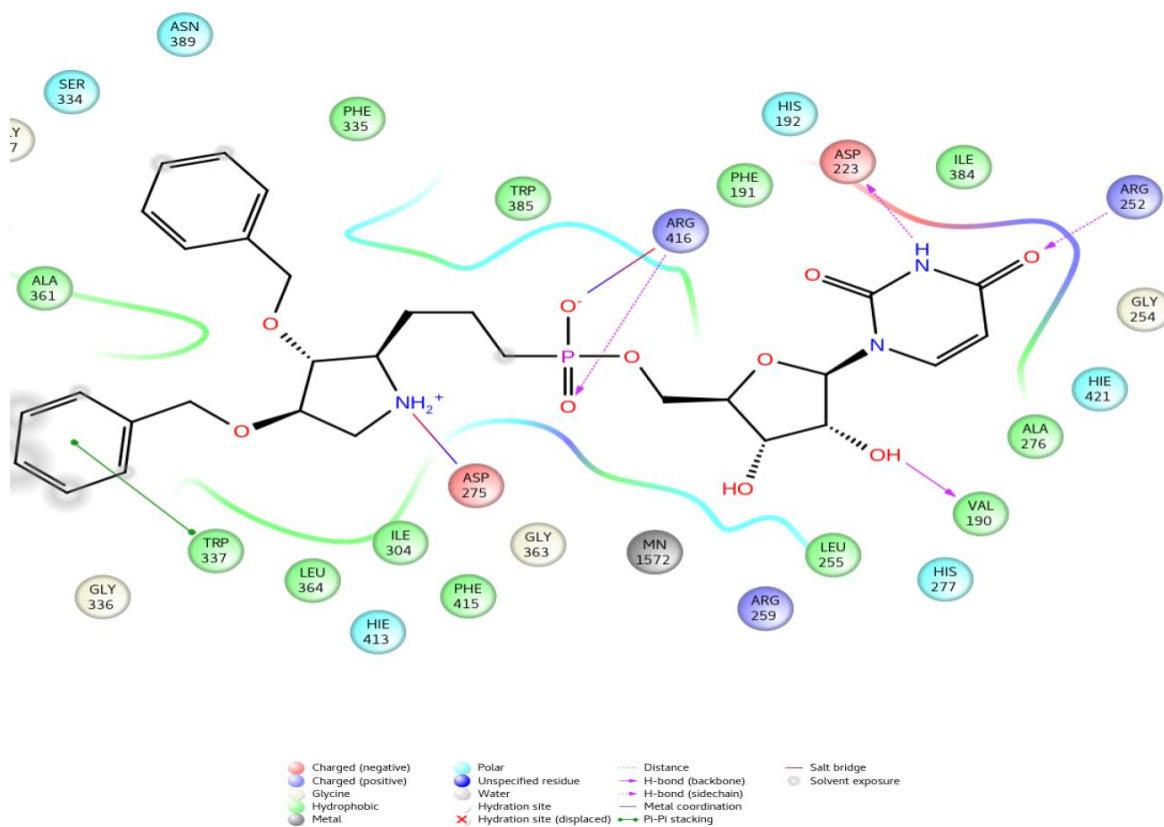


Figura S25: Interacciones 2D entre el ligando **9** y GalNAc-T3

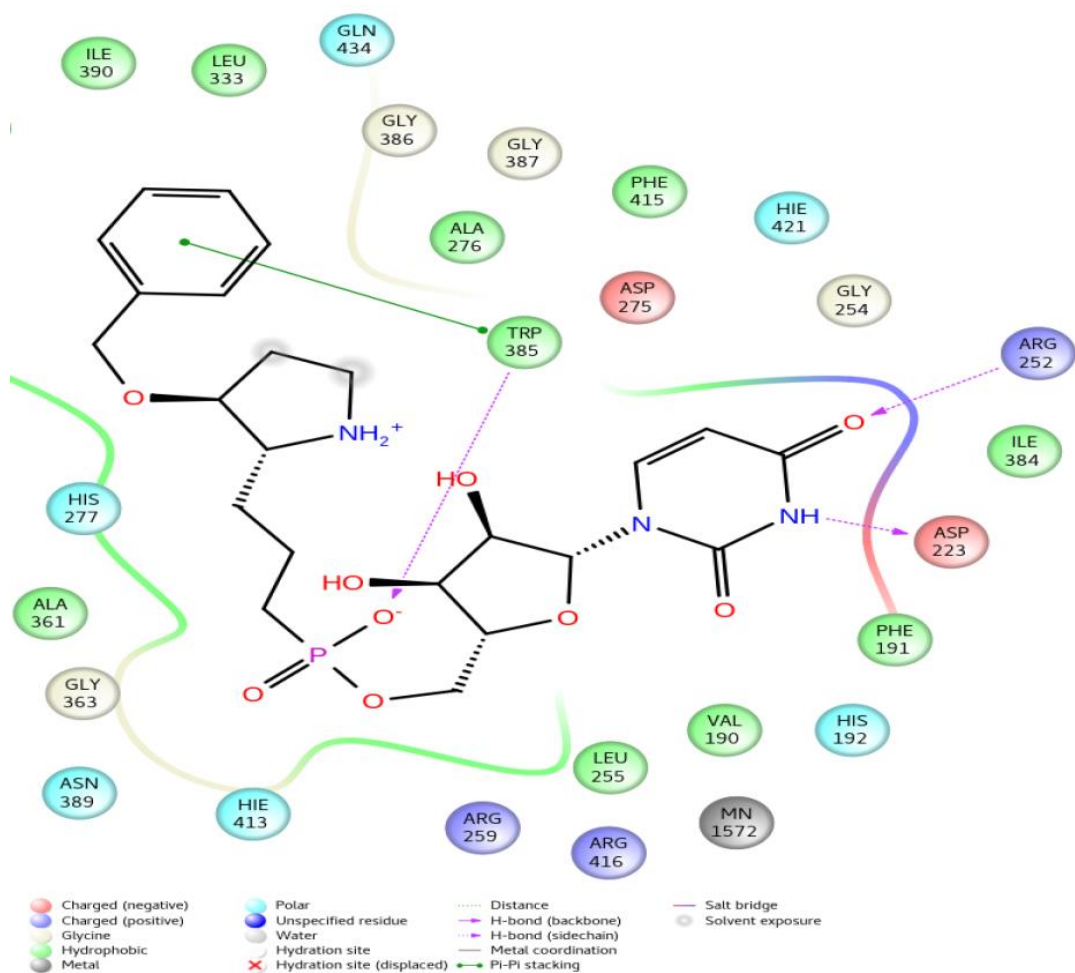


Figura S26: Interacciones 2D entre el ligando **11** y GalNAc-T3

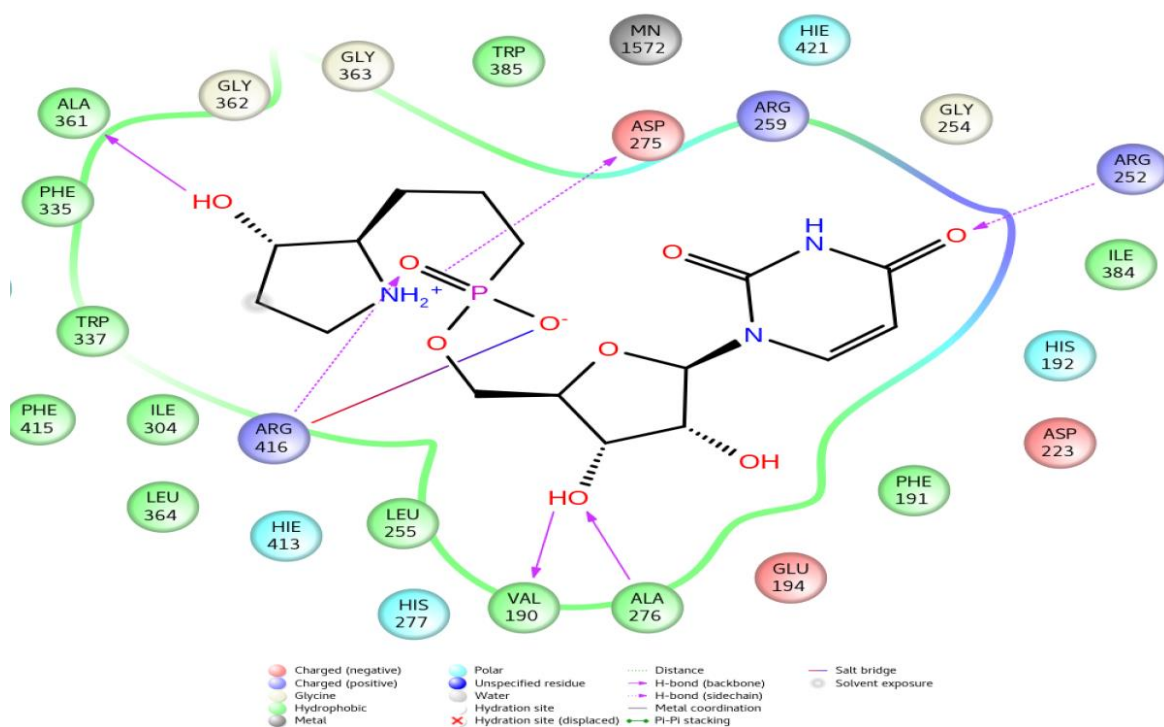


Figura S27: Interacciones 2D entre el ligando **12** y GalNAc-T3

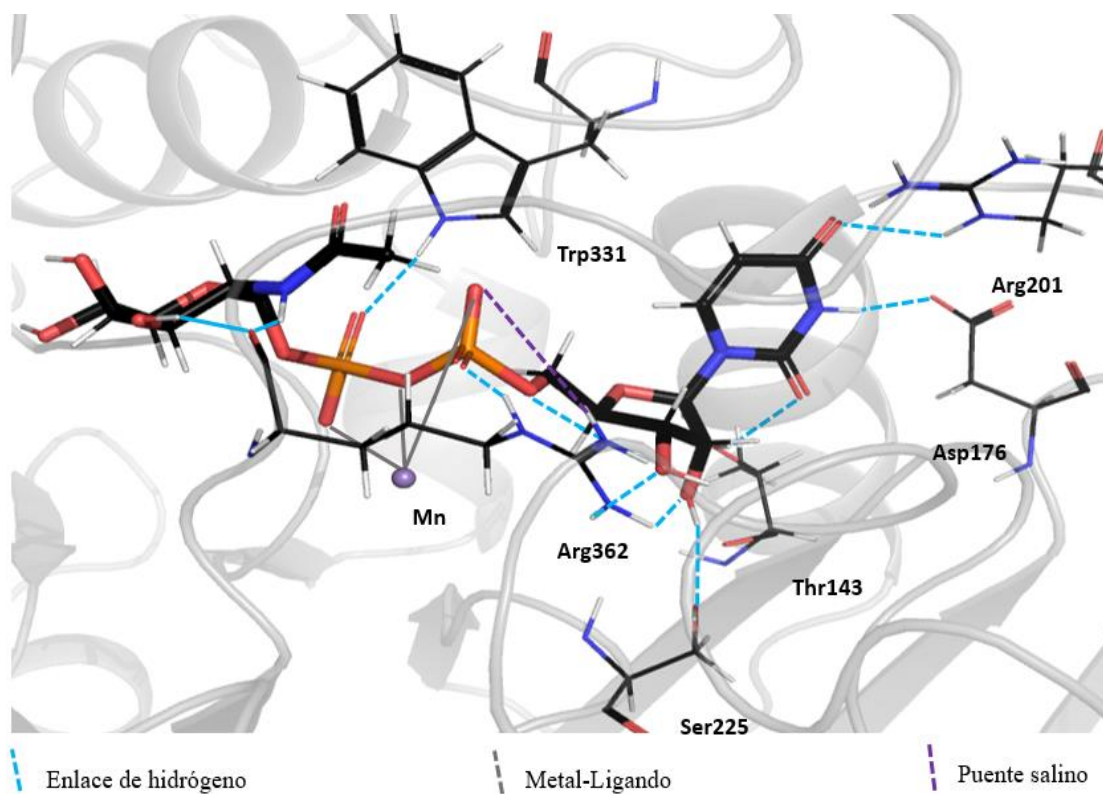


Figura S28: Interacciones 3D entre el ligando **L5** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

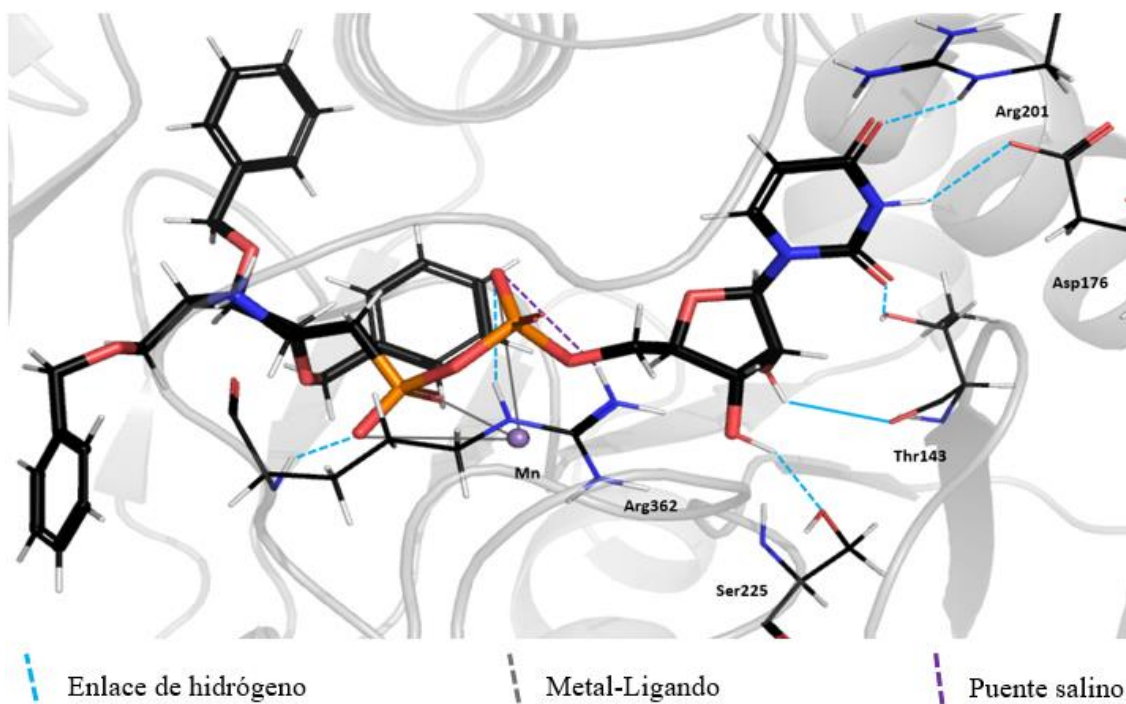


Figura S29: Interacciones 3D entre el ligando **1** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

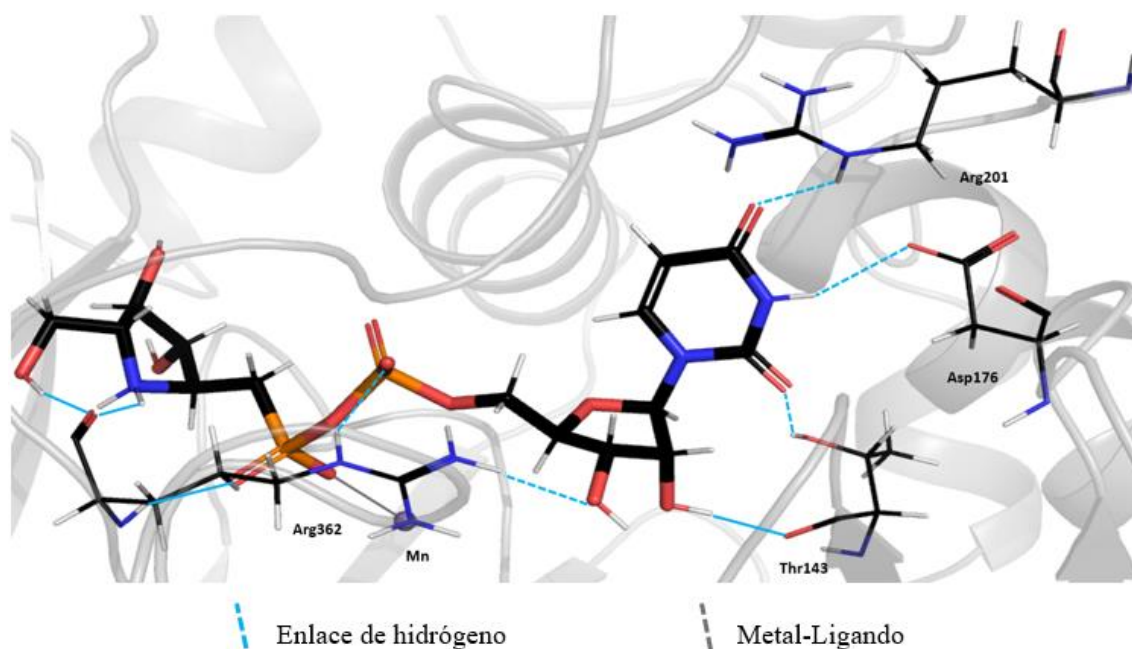


Figura S30: Interacciones 3D entre el ligando **2** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

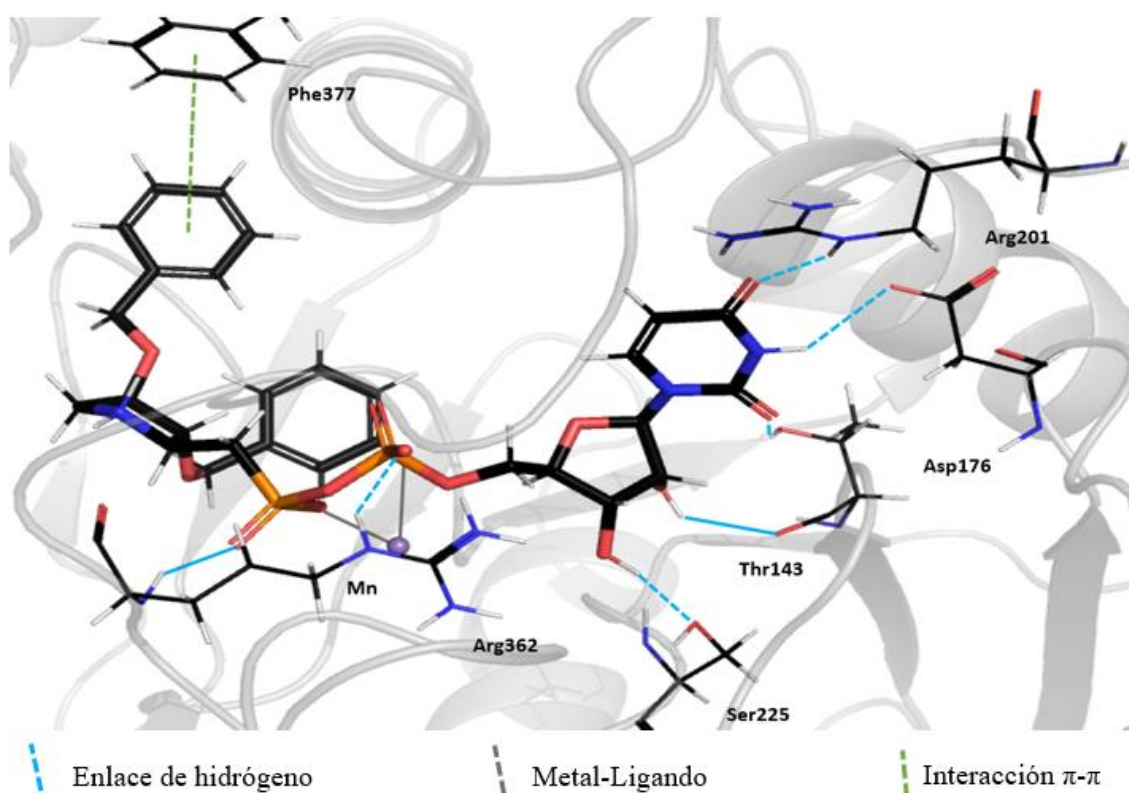


Figura S31: Interacciones 3D entre el ligando **3** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

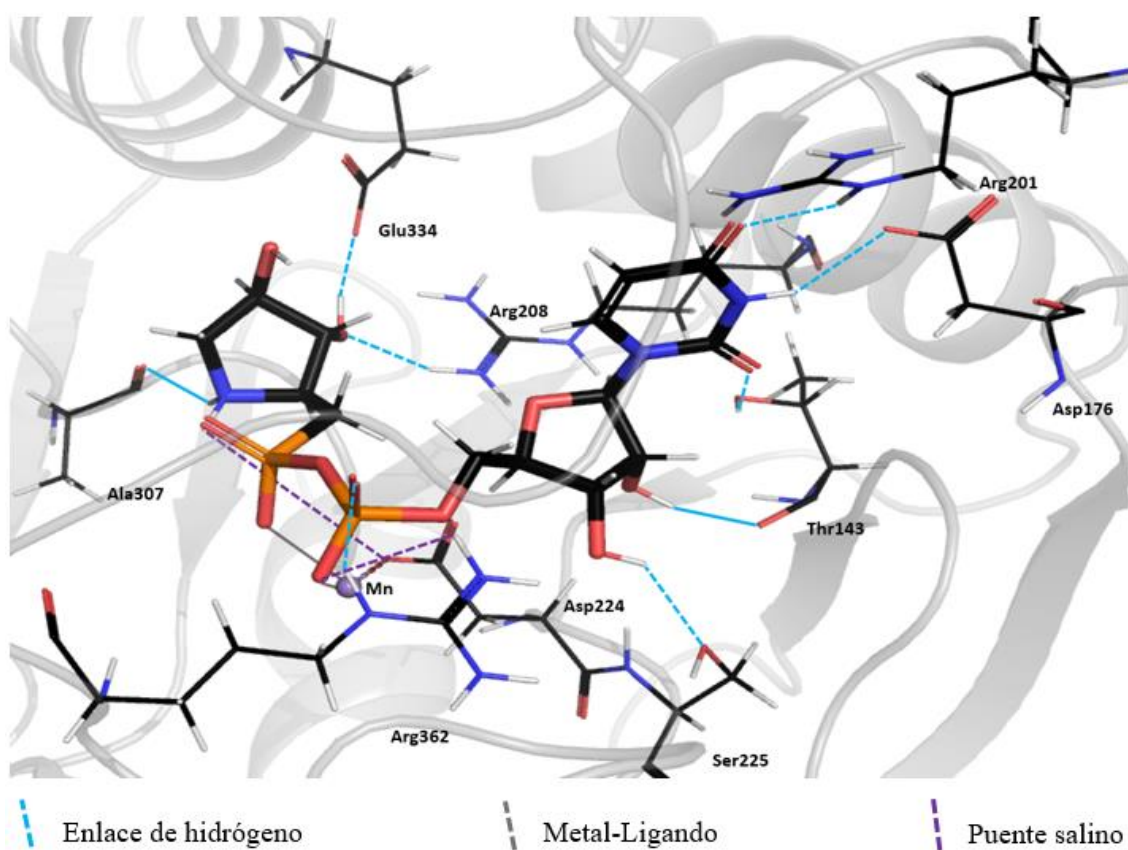


Figura S32: Interacciones 3D entre el ligando **4** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

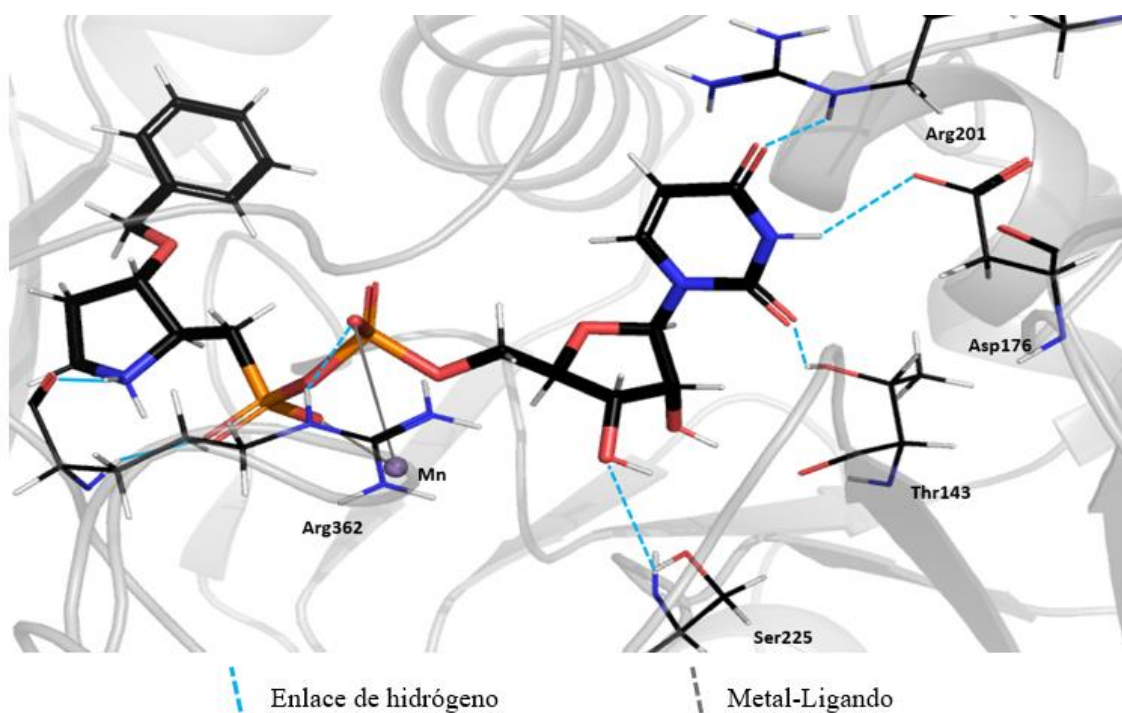


Figura S33: Interacciones 3D entre el ligando **5** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

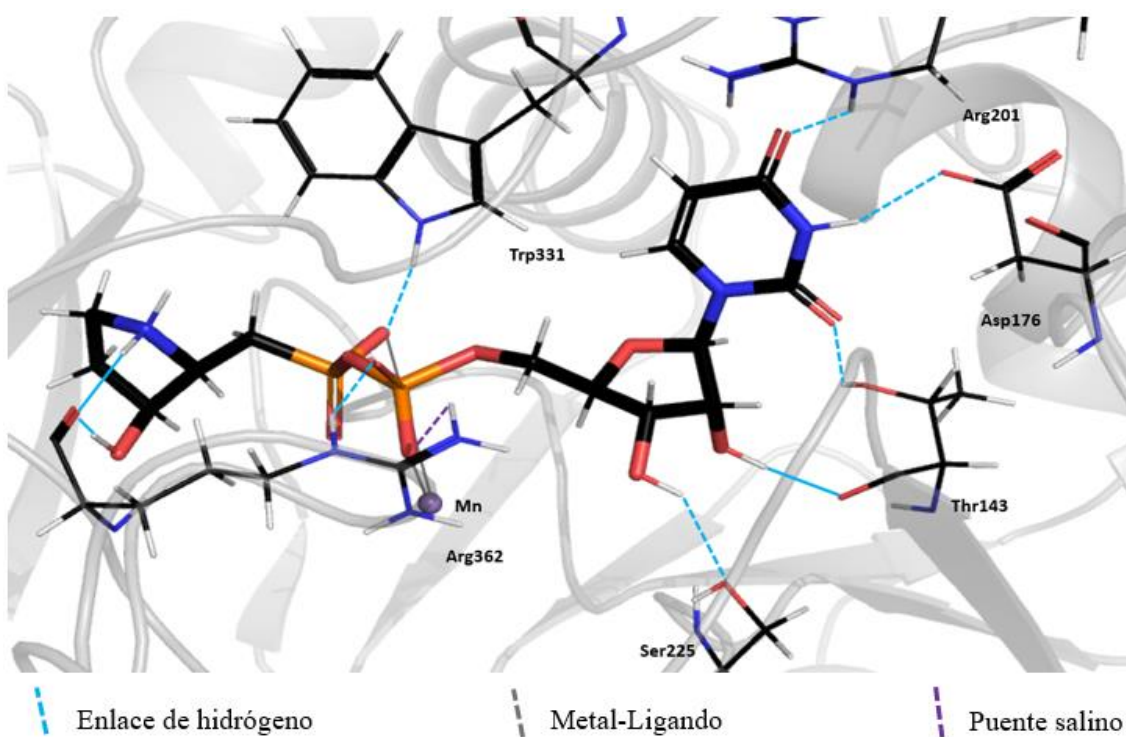


Figura S34: Interacciones 3D entre el ligando **6** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

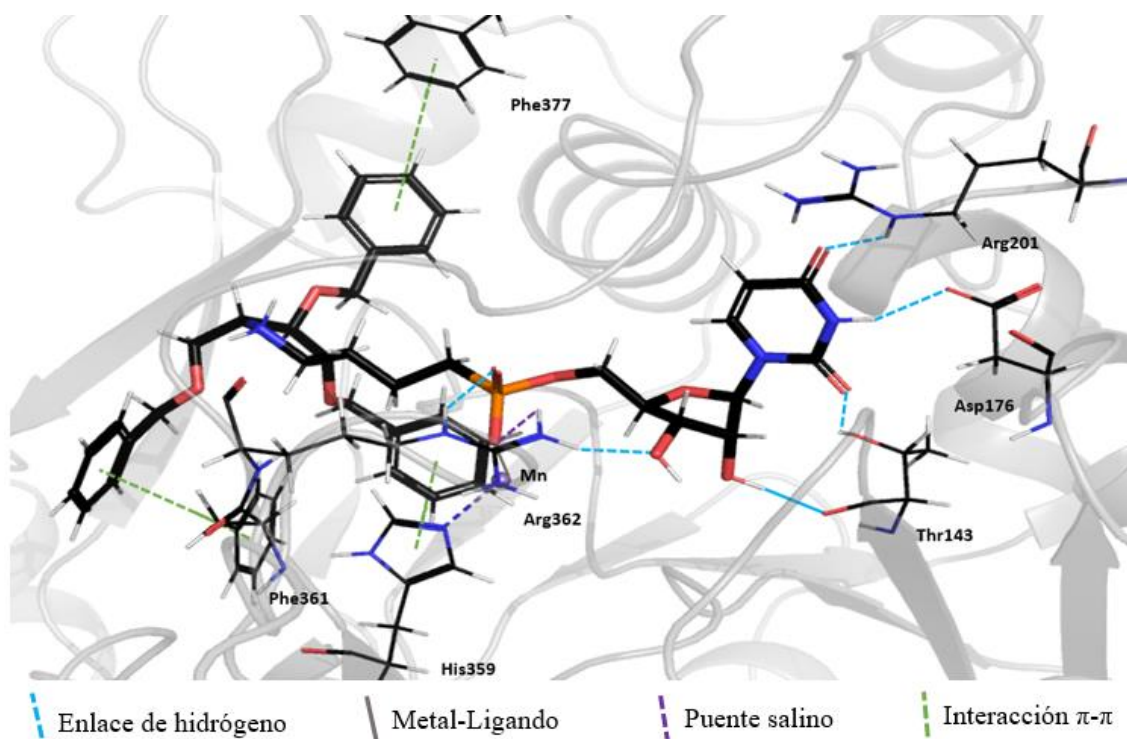


Figura S35: Interacciones 3D entre el ligando **7** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

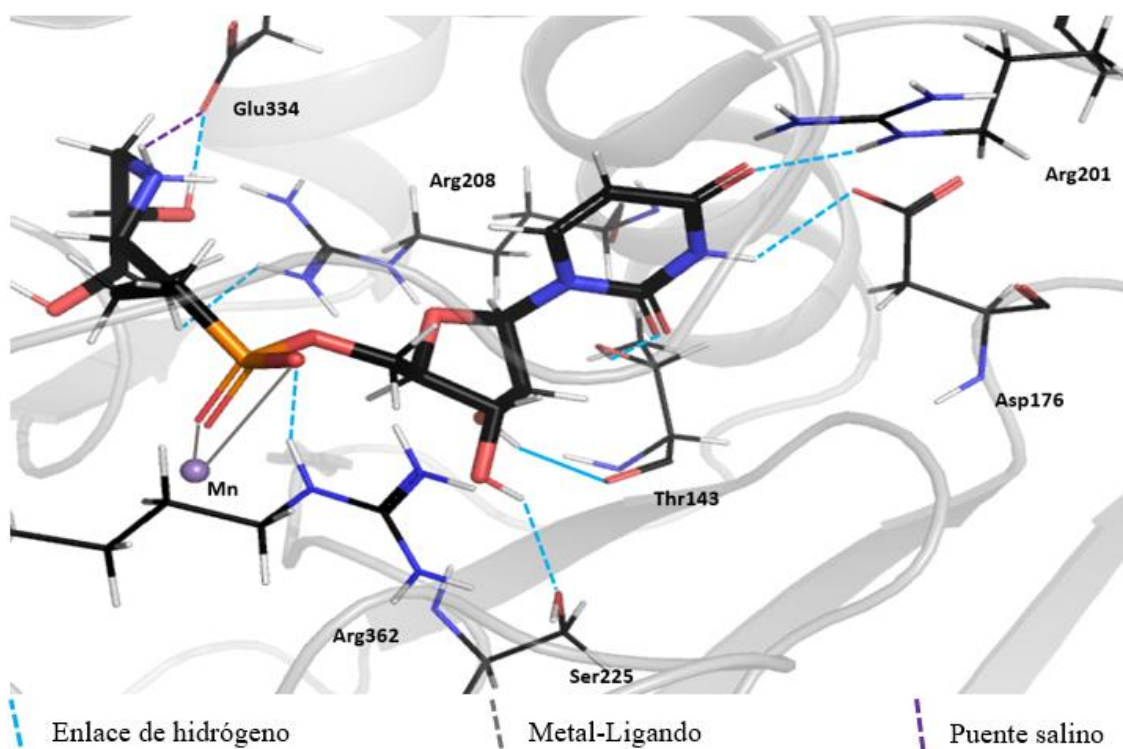


Figura S36: Interacciones 3D entre el ligando **8** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

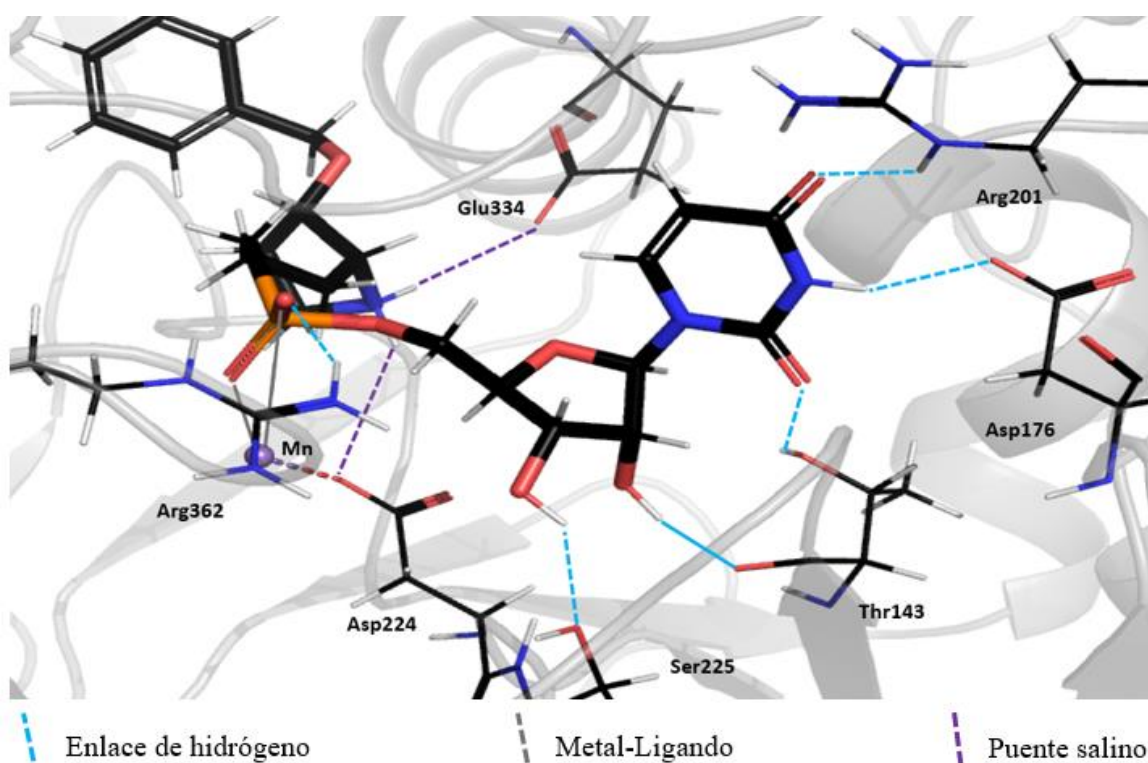


Figura S37: Interacciones 3D entre el ligando **11** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

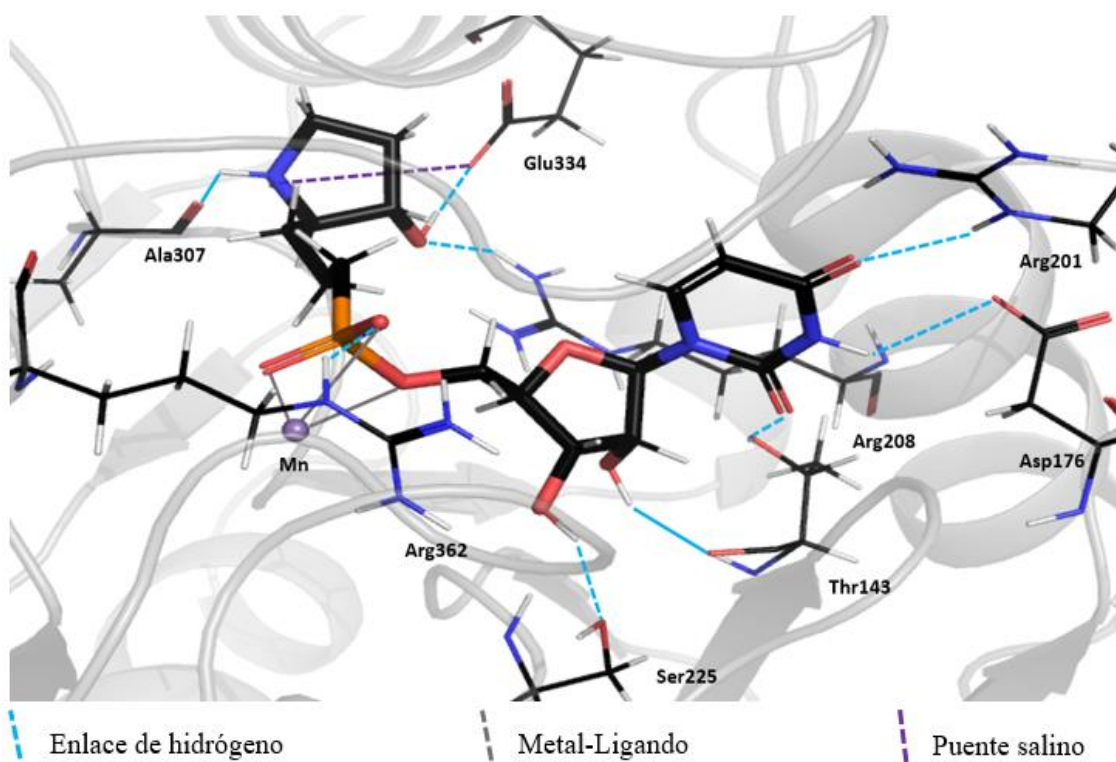


Figura S38: Interacciones 3D entre el ligando **12** y GalNAc-T2. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

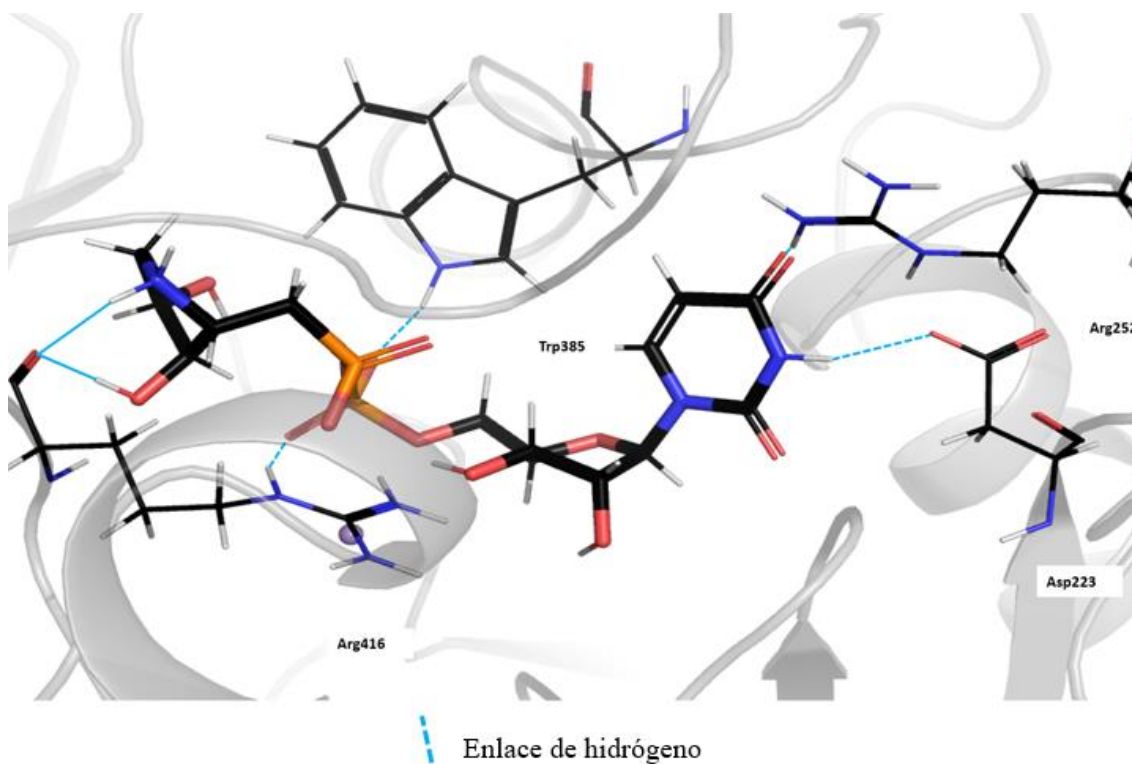


Figura S39: Interacciones 3D entre el ligando **4** y GalNAc-T3. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

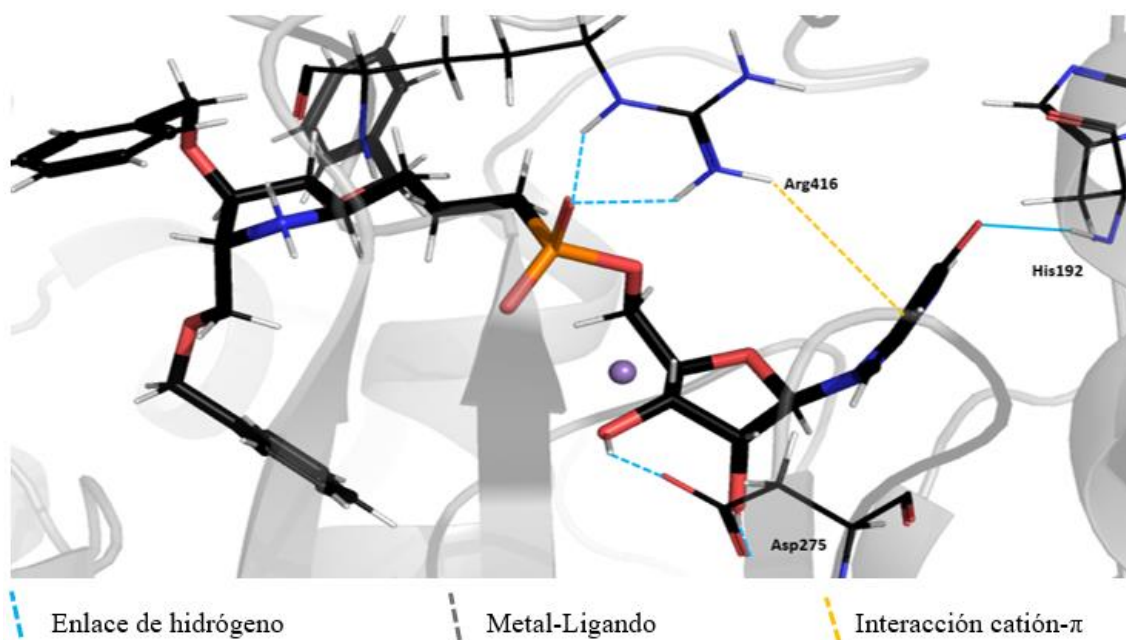


Figura S40: Interacciones 3D entre el ligando **7** y GalNAc-T3. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

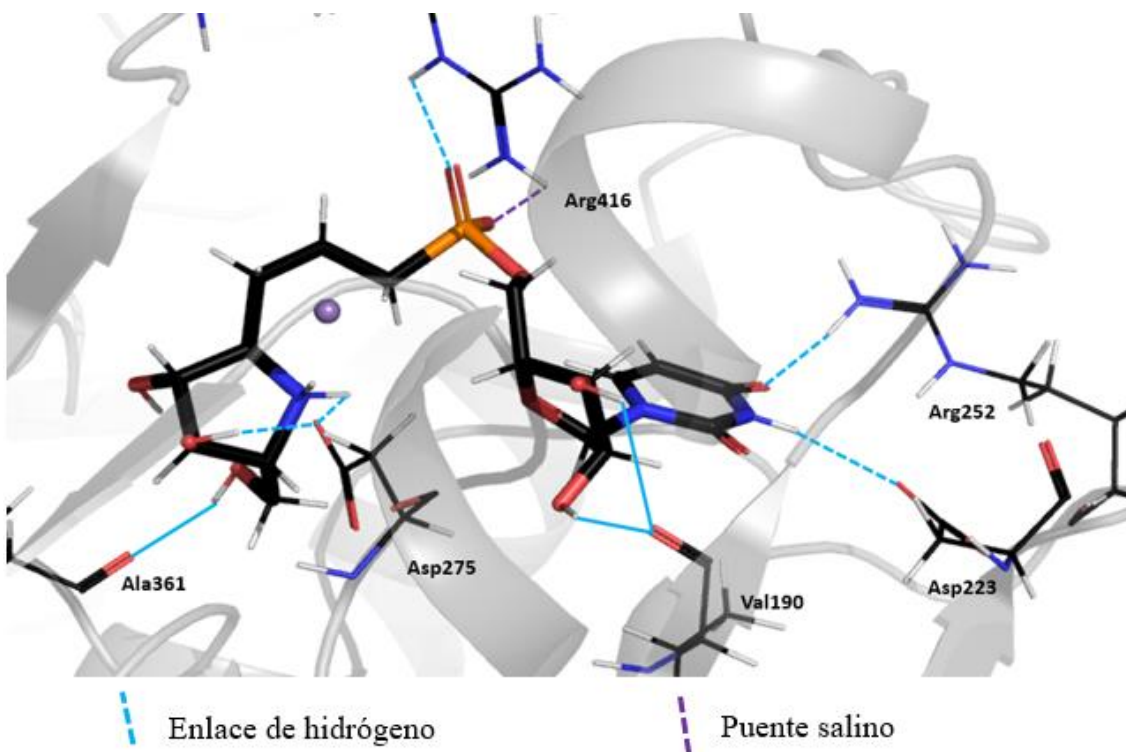


Figura S41: Interacciones 3D entre el ligando **8** y GalNAc-T3. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

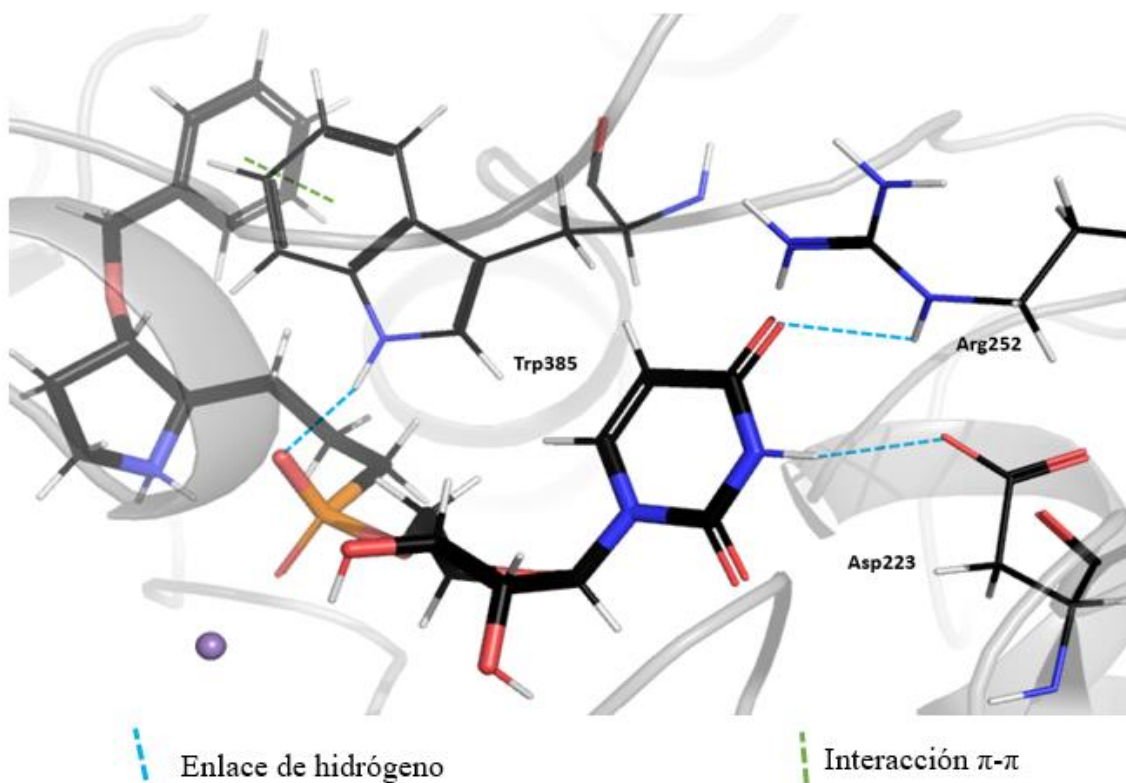


Figura S42: Interacciones 3D entre el ligando **11** y GalNAc-T3. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico

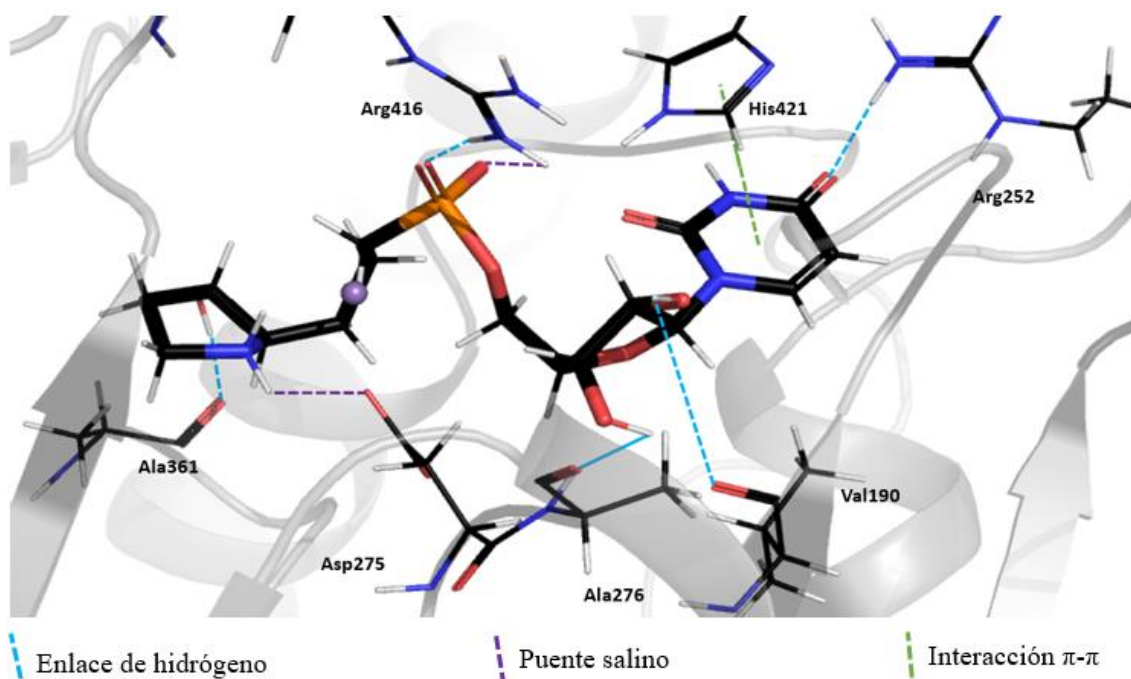


Figura S43: Interacciones 3D entre el ligando **12** y GalNAc-T3. Líneas punteadas son las interacciones de las cadenas laterales y las líneas continuas son con el esqueleto peptídico o con el centro metálico